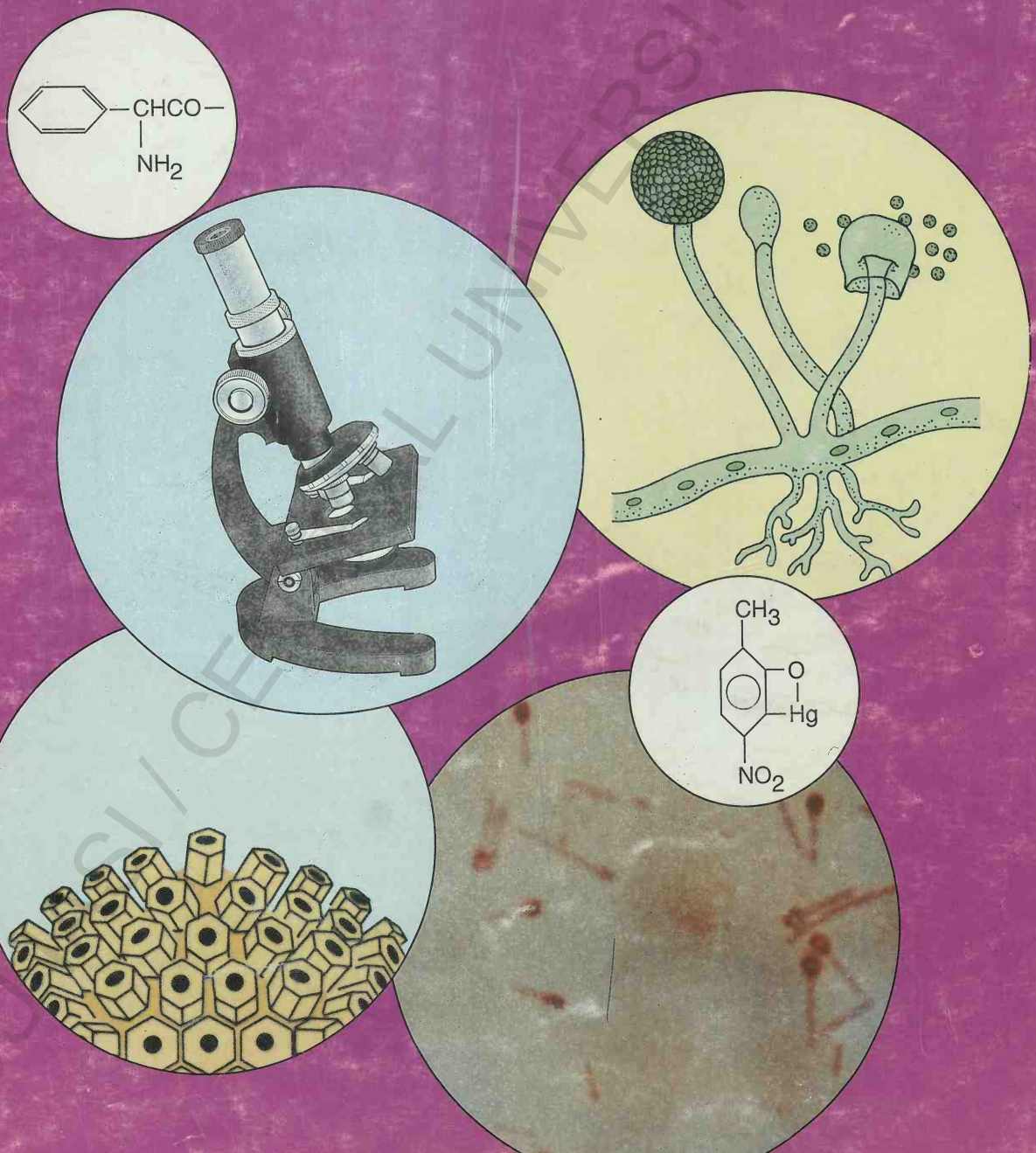
A. POIATĂ

MICROBIOLOGIE FARMACEUTICĂ



BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

PARTEA I-A. BIOLOGIA MICROORGANISMELOR	2
1. Introducere	3
2. Clasificarea microorganismelor. Caractere generale	10
3. Proprietățile principalelor specii bacteriene	31
4. Genetica bacteriană	43
5. Metode rapide pentru detectarea bacteriilor	62
6. Virusologie. Noțiuni generale	67
7. Levuri şi mucegaiuri	89
8. Principii de patogenitate şi epidemiologie microbiană	97
9. Mecanisme de apărare ale organismului gazdă. Noțiuni de imunologie	110
PARTEA A II-A. AGENTI CU ACTIUNE ANTIMICROBIANA	129
10. Antibiotice	130
11. Obținerea antibioticelor	152
12. Utilizarea clinică a agenților antimicrobieni	163
13. Acțiunea agenților chimici non-antibiotici asupra bacteriilor. Dezinfectante, antiseptice, preservanți	188
14. Determinarea activității in vitro a antisepticelor şi dezinfectantelor	210
15. Producerea şi controlul de calitate al produselor imunologice	222
16. Vaccinarea şi imunizarea	239
PARTEA A III-A. PARAZITOLOGIE	260
17. Noțiuni de parazitologie medicală	261
PARTEA A IV-A. MICROBIOLOGIE FARMACEUTICA	287
18. Microorganisme care afectează industria farmaceutică.	288
19. Contaminarea microbiologică şi prezervarea produselor farmaceutice	312
20. Produse farmaceutice sterile	327
21. Contaminarea produselor farmaceutice nesterile în spital şi în mediul comunitar	342
22. Sterilizarea	350
23. Controlul sterilizării şi asigurarea sterilității	361
24. Aplicații ale microorganismelor în domeniul ştiințelor farmaceutice	370
Index	385

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA I-A

BIOLOGIA MICROORGANISMELOR

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1

Introducere

Din timpuri străvechi oamenii au intuit că numeroase boli se răspândesc prin contact,însă în scrierile lui Hipocrate nu se precizează că o boală se poate transmite prin contaminare.

Conceptul de boală infecțioasă, transmisibilă, de origine microbiană a evoluat progresiv de-a lungul timpului, pentru a-şi găsi confirmarea ştiințifică la sfârşitul secolului al XIX-lea şi începutul secolului al XX-lea prin lucrările lui Pasteur şi Koch.

Oamenii au constatat că originea multor boli infecțioase este în mediu; astfel, un exemplu de norme privind igiena (păstrarea curățeniei, riscul contaminării plecând de la gunoaiele acumulate în aşezările umane) se regăsesc în Biblie. Armatele lui Alexandru Cel Mare utilizau la recomandarea lui Aristotel latrinele şi apa fiartă pentru băut.

Sulful şi mercurul erau utilizate ca "dezinfectante" încă din antichitate, iar în secolul al IV-lea, chirurgii indieni spălau instrumentele şi utilizau fumigațiile în sălile de operație. Mai târziu, Guy de Chauliac (1300 – 1368), medic al Papei Clement al VI-lea, preconiza utilizarea mercurului în aplicații locale, cunoscând şi "efectele secundare" ale tratamentului.

Vinul, oțetul şi mierea erau utilizate pentru comprese şi ca agenți de spălare a rănilor. De altfel, acidul acetic diluat este recomandat şi astăzi în tratarea rănilor şi a leziunilor chirurgicale infectate cu *Pseudomonas aeruginosa*.

Procedeul flambării, utilizat curent în laboratoarele de bacteriologie a fost recomandat de Cartea Numerelor: obiectele de mutal mai ales cele destinate bucătăriei, trebuiau trecute prin flacără pentru a le curăța, deoarece uneori era necesară mai mult decât o spălare mecanică, acesta reprezentând un exemplu de utilizare a căldurii pentru sterilizare.

Pesta, cu izbucnirile epidemice şi pandemice, pare a fi una din bolile infecțioase care a decimat omenirea încă din antichitate. Epidemiile din secolul al VI-lea şi ciuma neagră (care a debutat în 1346 şi a făcut să dispară un sfert din populația Europei) au curmat hibernarea intelectuală din Evul Mediu şi au trezit interesul pentru cauza şi transmiterea bolilor.

Girolamo Francastora (1483 – 1553), profesor de logică la Universitatea din Padua, a avut meritul de a fi pus primul bazele concepției moderne privind bolile contagioase şi a descris căile

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

posibile de contaminare în lucrarea ***De contagione***. El afirmă că bolile se răspândesc prin contact, referindu-se la *seminaria* sau germeni ai bolii, dar fără a avea ideea clară că aceştia sunt organisme vii.

Existenţa microorganismelor, intuită de Kircher (1655) a fost confirmată de Antoine van Leeuwenhoek în 1675. Acesta, considerat părintele Microbiologiei a folosit un microscop simplu, care putea mări de 300 de ori pentru a observa, în apă nişte animale "de o mie de ori mai mici decât ochiul unui păduche" pe care le-a denumit "animalicule". În 1675 Leeuwenhoek comunică într-o serie de scrisori, adresate către Royal Society of London, observaţiile sale, pe care le publică în lucrarea "*Arcana naturae ope microscopiorum detecta*" ("Tainele naturii descoperite cu ajutorul microscoapelor"). Multe din animaliculele observate de Leeuwenhoek erau protozoare, dar detaliile din desene, descrierile şi măsurătorile dovedesc, fără îndoială, că unele erau bacterii.

Ideea că anumite organisme mici pot apare din materia organică moartă a apărut în secolul al XVII-lea; teoria a fost discreditată de Francesco Redi (1626-1679).

Problema generaţiei spontane a microorganismelor microscopice a fost greu de rezolvat. Lazzaro Spallanzani (1729-1799) a arătat, în lucrările publicate în 1765 şi 1776 că aceste animalicule nu mai apar în infuzie dacă flaconul este fiert mai mult timp şi este închis ermetic, pentru a preveni pătrunderea aerului. Dar experimente ulterioare, cu rezultate mai puţin concludente şi aspectele speciale legate de formele de viaţă rezistente la căldură (sporii), au făcut ca ideea generaţiei spontane a microbilor să persiste.

Semnificaţia medicală a animaliculelor descoperite de Leeuwenhoek a fost demonstrată două sute de ani mai târziu, când, după noua concepţie, bolile epidemice erau produse de animalicule (teoria germenilor sau contagium animatum). Agostino Bassi (1773-1856) a fost prima persoană care a demonstrat în 1835-1836 că microbii sunt cauza unor boli; plecând de la urmărirea unei afecţiuni fungice contagioase, *muscardina*, boală epidemică a viermelui de mătase produsă de ciuperca *Botrytis bassiana*, a elaborat o teorie generală asupra contagiozităţii anumitor boli infecţioase umane de origine microbiană (gangrena, holera, sifilis, pesta, tifos). El a propus utilizarea unor produse germicide (alcool, acizi şi baze, clor, sulf) şi pentru holeră, izolarea pacientului şi dezinfecţia excrementelor şi a hainelor.

Cu un secol înaintea erei pasteuriene se cunoşteau de asemenea "dezinfectarea" apei de băut prin filtrare (pe nisip sau cărbune), spălarea şi aerisirea camerelor infectate, utilizarea hainelor speciale de către chirurgi. Începând cu secolul al XVIII-lea au fost descoperite principalele produse antiseptice şi dezinfectante ca rezultat al progreselor în chimie.

Au început să fie utilizate substanţe chimice dezinfectante mai noi şi mai pure. Clorura mercurică, sublimatul coroziv, cunoscute încă din Evul Mediu au fost utilizate pentru pansamente.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În 1798 a fost preparată pudra de talc, utilizată mai târziu de Alcock (1827) ca deodorant şi dezinfectant. În 1839 Davies propune utilizarea iodului pentru pansamente. Farmacistul francez Le Beuf, a preparat un extract de gudron de cărbune şi a utilizat ca agent emulgator saponine naturale din scoarţa de quillaia.

Suedezul Scheele a descoperit în 1774 clorul şi Berthollet hipocloriţii în 1789, substanţe deosebit de eficiente pentru a diminua efectele putrefacţiei şi care din 1793 au fost utilizate în chirurgie.

Labarraque (1825) a utilizat hipocloritul de calciu în spitale, închisori, pe ambarcaţiuni; de asemenea l-a utilizat cu rezultate bune în timpul epidemiei de holeră din 1832. Chirurgii parizieni au utilizat cu succes pansamente impregnate cu diluţia 1/8 de hipoclorit pentru a trata furuncule, gangrene, arsuri.

Chirurgul englez Lister (1827-1913) plecând de la observaţiile lui Pasteur privind utilizarea antisepticelor şi dezinfectantelor în scopul prevenirii septicemiei, care adesea era o complicaţie fatală a actului chirurgical, creează în 1867 conceptul de antisepsie în chirurgie. El pune la punct o tehnică de utilizare a antisepticelor pe baza criteriilor de eficienţă şi toleranţă.

Utilizarea anesteziei de către Morton (1846) a permis chirurgilor să efectueze acte terapeutice tot mai eficiente, dar totodată au crescut şi riscurile contaminării microbiene; gangrena şi septicemia postoperatorie au devenit frecvente. Eficienţa procedurilor chirurgicale a devenit dependentă de produşii descoperiţi de chimişti şi farmacişti, care au pus la dispoziţia chirurgilor noi compuşi activi asupra microorganismelor.

Două alte produse chimice au început să fie utilizate: peroxidul de hidrogen, studiat de Traugott (1893) şi compuşi ai clorului recomandaţi de Dakin (1915). Compuşii cuaternari de amoniu au fost introduşi de Jacobs în 1916.

În secolul al XVIII-lea, Carl Linnaeus (1707-1778), care în opera sa "*Systema naturae*" (1735) face o grupare sistematică a lumii vii, încadrează microorganismele în grupul "Chaos". În 1775, Terehovski a publicat o lucrare, în care, pe baza experimentelor demonstrează că organismele foarte mici prezente în infuziile bogate în substanţe organice cresc, se înmulţesc şi se mişcă prin forţe proprii, considerându-le adevărate animale miniaturale.

Către mijlocul secolului al XIX-lea existenţa germenilor (sau a microorganismelor) era recunoscută dar semnificaţia lor a rămas obscură până când chimistul francez Louis Pasteur (1822-1895) şi-a început experimentele privind fermentaţia. Prin lucrările sale, pune bazele microbiologiei moderne. Pasteur demonstrează că transformarea zahărului în alcool în procesul obţinerii vinului şi berii este determinată de activitatea unor microorganisme anaerobe, deci fermentaţia este viaţa fără aer. Fiecare tip de fermentaţie este produsă de un anumit microorganism, care determină o

transformare specifică a substratului pe care se dezvoltă, iar dezvoltarea unui alt microorganism deviază cursul normal al fermentației, determinând "boala" vinului sau a berii.

Falsitatea concluziei că microorganismele pot lua naştere din organizarea spontană a substanțelor organice supuse putrefacției sau fermentației, concluzie la care s-a ajuns prin ignorarea unor principii de bază ale microbiologiei (cum ar fi sterilizarea, asepsia) a fost demonstrată de Pasteur prin utilizarea unor baloane speciale cu "gât de lebădă" în care mediul de cultură sterilizat, putea rămâne steril timp îndelungat dacă se evita contaminarea lui cu germeni din aer. În acest fel Pasteur confirmă ceea ce Spallanzani arătase cu un secol înainte: microbii nu apar spontan din materia organică moartă.

De la bolile vinului şi ale berii, Pasteur şi-a îndreptat cercetările asupra bolii viermilor de mătase – *pebrina,* a modului de transmitere, a evoluției şi mijloacelor de prevenire. Revenind la bolile animalelor şi omului, Pasteur face o serie de observații care arată clar că microorganisme specifice produc boli specifice.

Prin cercetările lui Robert Koch (1843-1910) în Germania se confirmă definitiv teoria germenilor. În 1876 Koch demonstrează că bacteridia cărbunoasă (*Bacillus anthracis*) este agentul patogen al antraxului. El infectează cu sânge provenit de la nu animal mort prin antrax şi transmite infecția de la şoarece la şoarece, demonstrând, în fiecare etapă prezența microorganismului în sânge, apoi izolează bacteridia în cultură pură cercetând formarea de spori termorezistenți, germinarea şi patogenitatea specifică.

În 1882 Koch anunță că o importantă boală, tuberculoza, este cauzată de un microorganism, *Mycobacterium tuberculosis.*

Koch a adus contribuții importante în perfectarea unor metode simple de obținere a microorganismelor în cultură pură. În 1881, la Londra el demonstrează că se pot obține colonii izolate pe medii de cultură solidificate cu gelatină, înlocuită apoi cu agar.

Pornind de la aceste cercetări, Koch stabileşte criteriile conform cărora un microorganism izolat dintr-un organism bolnav să poată fi acceptat ca agent cauzal al bolii respective.

Aceste principii, cunoscute sub numele de postulatele lui Koch, deduse teoretic anterior de Pasteur sunt în număr de trei: 1). microorganismul implicat să poată fi pus în evidență în toate cazurile de boală şi răspândirea lui în organism să corespundă leziunilor constatate; 2). să poată fi izolat în cultură pură pe medii artificiale; 3). să reproducă, după ce este cultivat in vitro mai multe generații, boala la animale sensibile, de la care să poată fi izolat. În zilele noastre al patrulea postulat poate fi adăugat: pe durata infecției, în organism apar anticorpii.

Acestea sunt criteriile ideale şi nu sunt întotdeauna realizate în practică:ex. *Mycobacterium leprae* este agentul leprei, dar niciodată nu s-a reuşit cultivarea acestuia in vitro.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aplicarea acestor principii a făcut posibilă identificarea în perioada următoare, a patogenilor principalelor boli infecțioase.

În 1881, Koch a fost primul care a evaluat acțiunea sporicidă a peste 70 de compuşi chimici, în diferite concentrații, în soluții apoase, uleioase sau alcoolice; halogenii, clorura mercurică, permanganatul de potasiu şi acidul osmic au fost printre cei mai activi produşi.

Pasteur a folosit termenul de "microb", creat de medicul francez Sedillot (1878), expresie incorectă, deoarece are sensul de "viață scurtă" şi nu de dimensiuni mici şi în prezent, în limbajul ştiințific, nu se mai utilizează, deşi ştiința care are ca obiect microorganismele şi-a păstrat numele de microbiologie.

Denumirea de bacterie a fost introdusă de Ehrenberg (1838) care a creat denumiri de gen utilizate şi în prezent (*Bacterium, Spirillum, Spirochaeta*).

Izolarea agenților patogeni de către Pasteur şi Koch, a dus la apariția unei ştiințe noi – *imunologia.* Pasteur constată că agentul patogen al holerei găinilor, prin învechire îşi pierde capacitatea de a produce boala şi inoculat la păsări sănătoase, acestea devin rezistente la o reinfecție cu o cultură proaspătă. Aşadar, prin "vaccinare" păsările au devenit "imune". S-au pus, prin această descoperire bazele ştiințifice ale vaccinării, utilizată ca metodă de prevenire a infecțiilor. Pe baza aceluiaşi principiu, Pasteur a preparat vaccinul anticărbunos (1881) şi vaccinul antirabic (1885).

Mecinikov (1845-1916), arată că anumite celule din cavitatea generală a echinodermelor pot îngloba particule cu care vin în contact şi presupune că celule cu funcție asemănătoare numite de el "fagocite" ar putea exista şi la animalele care încorporează şi digeră microorganismele patogene pătrunse în mediul intern, stabilind astfel bazele imunității celulare, iar în 1890, Kitasato şi Behring descoperă alte mijloace împotriva agresiunii bacteriene, reprezentate de imunitatea umorală.

Destul de repede a fost realizat faptul că anumiți microbi sunt mai mici decât bacteriile. Ivanovski, în 1982, a anunțat că mozaicul tutunului, agent invizibil la microscop, care traversează filtrele bacteriologice, poate fi transmis unei plante sănătoase, prin filtratul frunzelor cu leziuni triturate. Cercetările ulterioare au dus la izolarea şi identificarea unui număr mare de virusuri patogene pentru plante, animale şi om. Un alt moment important în evoluția conceptelor de bază ale bacteriologiei şi virusologiei a fost descoperirea, independentă de către Twort (1915) şi d' Herelle (1917) a bacteriofagilor (sau simplu fagi) şi a fenomenului de lizogenie de către Bordet şi Ciucă (1921).

Epoca modernă a antisepticelor şi dezinfectantelor începe cu lucrările lui Kronig şi Ehrlich care pun bazele ştiințifice ale studiului mecanismului de acțiune şi descriu criteriile de evaluare a acestora in vitro. Ehrlich este şi creatorul teoriei moderne a dezinfecției şi chimioterapiei selective; bazat pe ideea existenței unei substanțe cu acțiune selectivă asupra paraziților, el sintetizează primii

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

compuşi activi, cu acţiune asupra spirochetelor şi protozoarelor. Se deschide astfel calea spre obţinerea substanţelor chimioterapeutice şi primul pas constă în sinteza sulfamidelor de către chimistul german Gerhard Domagk (1935).

În 1929, Fleming (1881-1955) deschide era antibioticelor; el constată că mucegaiul *Penicillinum* produce o substanţă cu acţiune antimicrobiană – penicilina, care mai târziu este obţinută şi purificată în laborator de Florey şi Chain (1940). Câţiva ani mai târziu, Waksman (1944) descoperă streptomicina.

Descoperirile în biochimie, genetica şi biologia moleculară au depins enorm de faptul că microbiologia a oferit prin bacteria *Escherichia coli*, un model unic de organizare structurală şi funcţională a unui sistem biologic simplu.

După ce a fost demonstrat că ADN este substratul material al ereditătii (Avery, MacLeod şi McCarthy, 1944) au urmat descoperiri fundamentale pentru biologia moleculară, privind structura acizilor nucleici şi a proteinelor, replicarea acizilor nucleici, biosinteza proteinelor, codul genetic, etc. Identificarea plasmidelor şi a enzimelor de restricţie a dus la crearea tehnicilor de inginerie genetică.

Fondatorul microbiologiei româneşti este Victor Babeş (1854 – 1926) care de-a lungul activităţii sale a studiat numeroase boli ale omului – lepra, tuberculoza, holera, febra tifoidă, turbarea. El a descoperit în neuronii animalelor moarte prin turbare, corpusculii Babeş-Negri, pe baza cărora se stabileşte diagnosticul retrospectiv al bolii. Împreună cu profesorul francez V. Cornil, a publicat primul tratat de bacteriologie din lume "*Les bacteries et leur rôle dans l'etiologie, l'anatomie et l'histologie pathologiques des maladies infectieuses*" (1885).

Ioan Cantacuzino (1863 – 1934) fondatorul institutului de microbiologie care îi poartă numele, a avut o contribuţie ştiinţifică originală prin lucrările privind aparatele şi funcţiile fagocitare în regnul animal, a contribuit la combaterea multor boli infecţioase prin organizarea producţiei de seruri şi vaccinuri în ţara noastră.

C. Levaditi (1874 – 1953) a făcut cercetări în domeniul imunologiei, virusologiei şi chimioterapiei.

Constantin Ionescu-Mihăileşti (1883 – 1962), şi-a adus contribuţia în domeniul imunologiei, virusologiei şi microbiologiei generale.

Mihai Ciucă (1883 – 1969), prin cercetările sale, având ca obiect bacteriofagul, lizogenia, infecţia stafilococică, infecţia de spital, a avut o contribuţie valoroasă la progresul microbiologiei.

Ştefan S. Nicolau (1886 – 1967), creatorul şcolii româneşti de virusologie, a făcut cercetări asupra herpesului, turbării, febrei aftoase, hepatitei virale, oncogenezei.

Obiectul de studiu al microbiologiei îl reprezintă microorganismele, care alcătuiesc un grup

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

foarte mare şi eterogen ca morfologie, activitate biologică, având drept caractere comune dimensiunile, (sunt vizibile numai la microscop), organizarea celulară, structura internă relativ simplă. Virusurile, entităţi cu dimensiuni infime, alcătuite din proteine şi acizi nucleici, dar fără organizarea structurală şi funcţională a celulei, care nu se pot multiplica decât în celula vie, constituie de asemenea obiect de studiu pentru microbiologie.

Microbiologia este o ştiinţă relativ tânără dar diversitatea microorganismelor şi a activităţii desfăşurate în natură, a făcut ca în cadrul acesteia să se diferenţieze o serie de discipline microbiologice independente, care după criteriul aplicaţiilor practice, se grupează în:

- microbiologia medicală (umană şi veterinară);
- microbiologia industrială;
- microbiologia geologică;
- microbiologia insectelor;
- microbiologia agricolă;
- microbiologia cosmică.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2

Clasificarea microorganismelor. Caractere generale

Până la inventarea microscopului, când au fost descoperite organisme invizibile cu ajutorul ochiului, lumea vie era împărțită în plante și animale. În 1866, Haekel propune un nou regn, *Protista*, care include bacterii, fungi, protozoare și alge.

Celula, unitatea structurală a microorganismelor, asemănătoare ca structură cu celula vegetală și animală, prezintă particularități structurale și funcționale, conform cărora microorganismele se împart în două grupe: **procariote** – bacterii și cyanobacterii; **eucariote** – protozoare, fungi microscopici, alge microscopice.

Un alt grup de organisme, care nu se încadrează în regnul *Protista*, virusurile, sunt parazite intracelulare obligatorii, incapabile de a supraviețui și a se multiplica independent. Virusurile au o structură subcelulară, cu un singur acid nucleic (ADN sau ARN) și un înveliș proteic (capsida) care poate fi închisă într-o membrană (anvelopă).

Între microorganismele procariote și eucariote sunt diferențe structurale, funcționale și de compoziție chimică. Diferența fundamentală se referă la genomul bacterian, reprezentat printr-o moleculă circulară de ADN, lipsit de membrana nucleară (Tabel 2.1).

Tabel 2.1. Diferențele între celula procariotă și eucariotă

Caracteristici	Procariote	Eucariote
Structura nucleului ADN	Cromozom circular, unic, lipsit de membrană nucleară	Mai mulți cromozomi; ADN este legat de histone
Membrana nucleară	Absentă	Prezentă
Structura citoplasmei Reticul endoplasmatic Mitocondrii Ribosomi Lisosomi	 Absent Absente Tip 70S Absenți	 Prezent Prezente Tip 80S Prezenți
Membrana citoplasmatică	Prezent; lipsită de steroli, excepție *Mycoplasma*	Prezentă; conține steroli
Peretele celular	Conține peptidoglicani, proteine și lipide	Absent, sau când există conține celuloză, chitină, proteine,siliciu
Capsula	Prezentă frecvent	Absentă
Flageli	Facultativ, cu dimensiuni microscopice	Facultativ, cu dimensiuni microscopice
Curenți citoplasmatici	Absenți, excepțional, dar foarte slabi	Prezenți
Tipul de deviziune	Directă (sciziparitate)	Mitoză

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacteriile: morfologie, structură, taxonomie

Bacteriile sunt microorganisme procariote, unicelulare cu o structură mai puțin complexă decât celula organismelor eucariote.

Morfologia şi dimensiunile bacteriilor

Celulele tinere, active fiziologic în condiții favorabile de mediu, conferă morfologia tipică a bacteriilor.

Peretele rigid al bacteriilor determină forma acestora. În general, se disting trei tipuri morfologice de bază:

a. *Sferică* (coci). Celulele sunt sferice (*Staphylococcus aureus*), elipsoidale (*Streptococcus viridans*), lanceolate (*Diplococcus pneumoniae*), reniforme (*Neisseria gonorrhoeae*). Dimensiunile cocilor sunt de 0,2 - 2μ.

b. *Cilindrică* (bacili). Bacilii prezintă variații ale extremităților celulei, care pot fi în formă de fus, măciucate, retezate, rotunjite. Lungimea bacililor este de 0,5 - 10μ .

c. *Spiralată* (vibrioni, spirili, siprochete). Bacteriile sunt cilindrice şi prezintă curburi ale axului longitudinal. Diametrul longitudinal este de 6 - 100μ .

Aranjamentul bacteriilor după diviziune (criteriu de identificare şi clasificare) depinde de planurile de diviziune succesivă a celulei şi tendința celulelor de a rămâne unite între ele: ex. lanțuri – streptococi, grămezi – stafilococi, în perechi – diplococi; câte patru – tetrade; pachete cubice – sarcina (Fig.2.1).

În culturile bacteriene, sub acțiunea unor factori nefavorabili din mediu, apar forme atipice, de involuție - bacterii globuloase, filamentoase, în formă de Y.

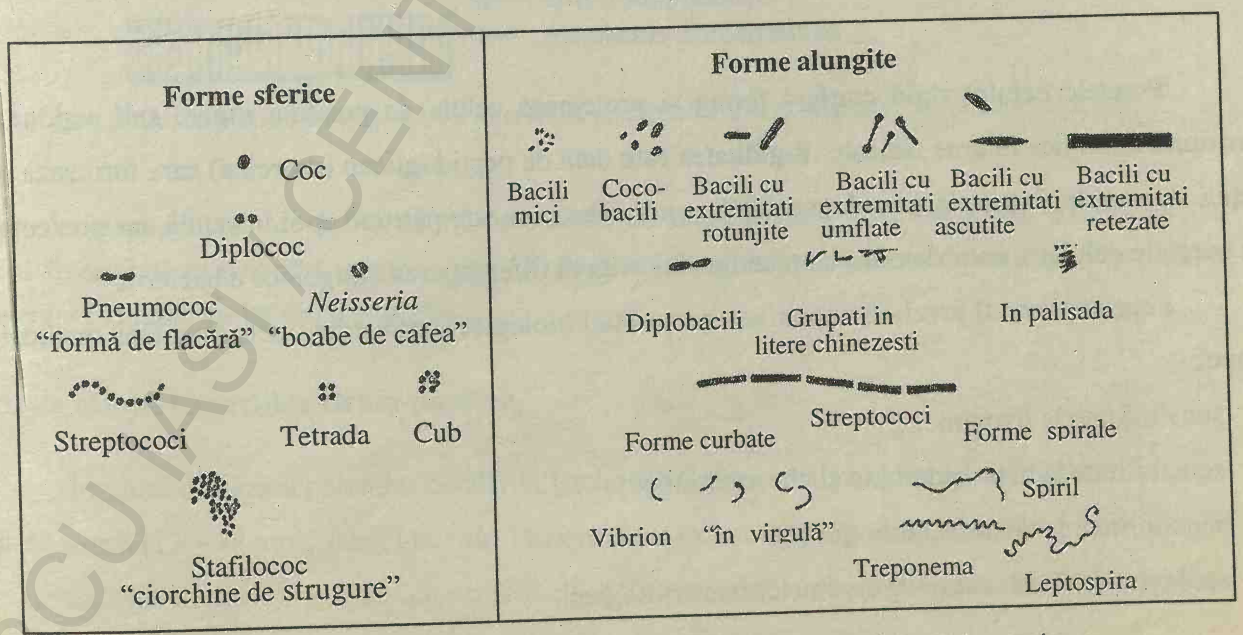


Fig.2.1 Reprezentarea schematică a diverselor morfologii bacteriene

BCU IAŞI - CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Structura celulei bacteriene

În structura celulei bacteriene se disting *elemente structurale constante* (perete celular, membrană citoplasmatică, citoplasmă, material nuclear, organite citoplasmatice, incluziuni citoplasmatice) şi *elemente structurale inconstante*, prezente doar la anumite specii bacteriene (capsula şi stratul mucos, flagelii, pilii, sporul) (Fig.2.2).

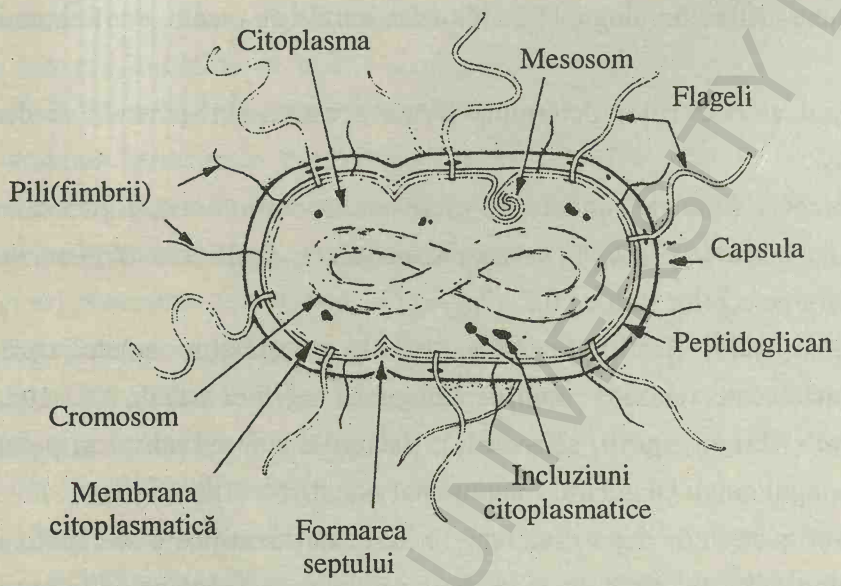


Fig.2.2 Structura tipică a celulei bacteriene

Peretele celular

Peretele celular rigid conferă forma şi protejează celula de posibila rupere sub acţiunea presiunii osmotice interne ridicate. Rigiditatea este dată de peptidoglican (mureină) care formează o reţea. Are rol în fixarea la suprafaţa celulei a unor substanţe care pătrund apoi în celulă, iar prezenţa în peretele celular a unor determinanţi antigenici asigură diferenţierea antigenică a bacteriilor.

Peptidoglicanul prezintă numeroase proprietăţi biologice dintre care unele cu intens medical direct:

- sensibilitate la lizozim;
- sensibilitate la beta-lactamine şi alte antibiotice;
- sensibilitate la dezinfectante (fenol);
- se degradează sub acţiunea enzimelor bacteriofagice.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

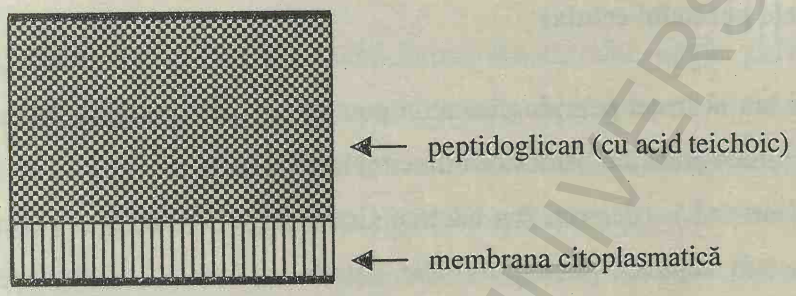
Coloraţia Gram împarte bacteriile în două grupe mari: Gram-pozitive şi Gram-negative. Reacţia la coloraţia Gram depinde de structura peretelui celular (Fig.2.3):

În prima etapă a coloraţiei se realizează un complex colorant solubil în alcool (cristal violet – lugol) care colorează în violet citoplasma tuturor bacteriilor . În a doua etapă intervine decolorarea cu un alcool, care traversează peretele bacteriilor Gram-negative şi dizolvă complexul colorant. La bacteriile Gram-pozitive, peretele nu este străbătut de alcool.

Se disting aşadar două tipuri de bacterii:

- primul, care sub acţiunea alcoolului se decolorează complet;
- al doilea, care rămâne colorat în violet.

a. Peretele celulei Gram-pozitive



b. Peretele celulei Gram-negative

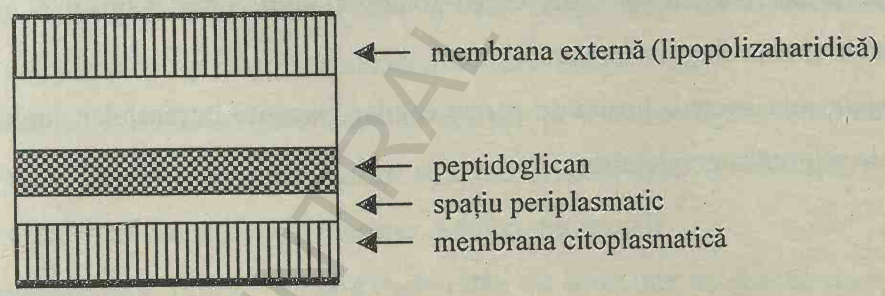


Fig.2.3 Comparaţie între structura peretelui bacteriilor Gram-pozitive şi Gram-negative

În etapa a treia are loc o scurtă recolorare cu fucsină când doar bacteriile decolorate cu alcool fixează acest colorant şi apar roşii – bacterii Gram-negative. Bacteriile Gram-pozitive şi-au conservat culoarea violet din prima etapă.

Peretele celulei bacteriilor Gram-pozitive

Structura de bază a peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive este reprezentată de un strat peptidoglican (15 – 18 nm), şi acid teicoic. Deoarece nu există spaţiu periplasmatic, peptidoglicanul este strâns lipit de membrana citoplasmatică. În peretele celular mai pot fi prezenţi determinanţi antigenici (ex. antigene polizaharidice şi proteice la streptococi).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Peretele celulei bacteriilor Gram-negative este mai complex, mai subțire (10 – 15 nm) și se caracterizează prin prezența la exteriorul păturii fine de peptidoglican a membranei externe care conține proteine specifice – lipopolizaharide și lipoproteine. Membrana externă previne piederea proteinelor periplasmatice și formează o barieră protectoare în calea enzimelor hidrolitice și a substanțelor toxice, cum ar fi bila, în tractusul digestiv. Proteinele membranare (porinele) reglează transportul moleculelor prin porii membranei; acest proces este în parte responsabil de rezistența bacteriilor Gram-negative la agenții antimicrobieni.

Lipopolizaharidele (LPS) sunt responsabile de specificitatea antigenică somatică (antigen 0). Lipidul component (lipidul A; endotoxina) este responsabil de proprietățile toxice ale acestor bacterii.

Bacterii cu deficiențe ale peretelui celular

În urma alterării sau absenței peptidoglicanului peretele își pierde rigiditatea și bacteria are tendința de a liza sub acțiunea presiunii osmotice intracitoplasmatice.

1. *Sferoplastii* (forme L) – derivați din bacterii Gram–negative, al căror perete este alterat (de exemplu sub acțiunea penicilinei). Se pot diviza într-un mediu adecvat și dacă agentul inductor este suprimat, revin la forma inițială.
2. *Protoplastii* derivă din bacteriile Gram-pozitiv și sunt complet lipsiți de perete. Nu se pot divide și sunt fragili osmotic.

Micoplasmele sunt bacterii lipsite de perete celular, parazite intracelular, unde izotonismul celulei parazitate le asigură supraviețuirea.

Membrana citoplasmatică

Membrana citoplasmatică aderă la suprafața internă a peretelui celular; este compusă din fosfolipide și proteine și are o structură trilamelară.

Suprafața membranei citplasmatice este o zonă deosebit de activă: controlează, prin proprietățile de semipermeabilitate pătrunderea și ieșirea din citoplasmă a ionilor și metaboliților, este sediul a numeroase enzime implicate în transportul activ al nutrienților în diverse procese metabolice.

Invaginările membranei citoplasmatice (veziculare, lamelare, tubulare) în citoplasmă, formează alături de membrana citoplasmatică "unit membrana".

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La bacteriile Gram-pozitive aceste invaginări se numesc mezozomi şi au aspectul unor pungi. Mezozomii sunt mai puțin dezvoltați la bacteriile Gram-negative şi au forma unor membrane pliate.

Funcțiile membranei citoplasmatice sunt numeroase; formează o barieră osmotică veritabilă (transport pasiv) iar prin sistemele de transport (permeaze) asigură penetrarea activă şi selectivă a substanțelor, conține numeroase enzime care intervin mai ales în metabolismul energetic: este un punct de impact cu diverse substanțe antimicrobiene: dezinfectante, antiseptice, antibiotice, care acționează la acest nivel.

Citoplasma

Citoplasma este un sistem coloidal format din proteine, lipide, glucide, apă, săruri minerale, în concentratii care diferă funcție de specie, vârsta celulei, condiții de mediu. La celulele tinere aderă strâns de peretele celular şi este intens colorabilă. Conținutul mare în ARN (care alături de proteine, intră în structura ribozomilor) asigură bazofilia intensă a citoplasmei.

În citoplasmă se găsesc materialul nuclear, organitele citoplasmatice şi incluziunile.

Materialul nuclear est organizat într-un singur cromosom circular, ataşat de mezozomi. Molecula de ADN bacterian este de 1000 ori mai lungă decât celula bacteriană, dar este rulată foarte strâns în celulă, şi lipsită de membrana nucleară.

Cromosomul bacterian este locul de acțiune pentru unii agenți antimicrobieni: quinolone (inhibă ADN – gyraza) nitroimidazoli (fragmentează ADN la bacteriile anaerobe stricte), rifampicine (inhibă transcripția prin blocarea ARN polimerazei).

Ribosomii sunt formați din două subunități cu constante de sedimentare diferite: de 50S şi de 30S. Rolul lor este esențial în proteinosinteză.

Incluziunile citoplasmatice sunt substanțe inerte, de rezervă, în care este stocată energia: polifosfați minerali (volutină), poli-β-hidroxibutirat (lipid), polisaharide (amidon, glicogen). Incluziunile de volutină au fost descoperite de Victor Babeş (1887) la *Corynebacterium diphteriae* şi *Mycobacterium tuberculosis*.

Capsula

Unele bacterii secretă la suprafața celulei substanțe mucoase care se dispun condensat pe suprafața bacteriei (capsula). De natură polisaharidică, ocazional polipeptidică, capsula conferă

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

proprietăți patogene (virulență) unor specii bacteriene şi asigură rezistența la fagocitoză.

Capsula este un element important pentru identificarea bacteriilor. Reacția între capsulă şi un anticorp specific cunoscut, permite identificarea serologică a anumitor specii.

Glicocalixul

Are o structură reticulară laxă, formată din filamente polisaharidice care ajută la adeziunea bacteriilor de țesuturi sau de biomateriale.

Flagelii şi pilii

Flagelii sunt formați din molecule de proteine, cu rol în mobilitatea celulei. Numărul şi dispoziția lor are importanță pentru clasificarea taxonomică a bacteriilor. Microorganismele cu un singur flagel, dispus la unul sau ambele capete se numesc monotriche; când mai mulți flageli sunt grupați la unul sau ambele capete – lofotriche; când flagelii sunt implantați pe toată suprafața bacteriei – peritriche (Fig.2.4).

Pilii (fimbriile) sunt scurți, rigizi, de natură proteică, dispuşi pe suprafața a numeroase bacterii Gram-negative. Ei asigură aderența pe celula țintă şi constituie astfel un factor de patogenitate care favorizează colonizarea bacteriei pe mucoasele gazdei. Pilii sexuali intervin în transferul de ADN în timpul fenomenului de conjugare bacteriană.

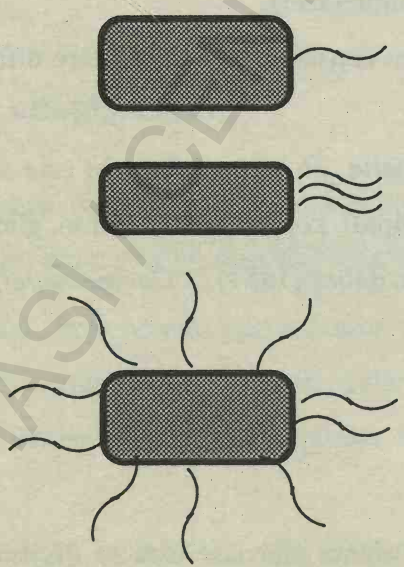


Fig.2.4 Amplasarea flagelilor la bacterii

BCU IASI CULTURAL UNIVERSITY LIBRARY

Pigmenții

Unele specii bacteriene produc pigmenți care conferă coloniei o culoare caracteristică. Astfel, *Staphylococcus aureus* produce un pigment galben, *Serratia marcescens* un pigment roşu. Rolul lor este de a oferi celulei protecție față de efectul nociv al luminii solare.

Sporul

Formarea sporului este un mijloc prin care unele microorganisme pot supraviețui când condițiile de mediu devin nefavorabile. Când condițiile redevin favorabile, sporul se transformă în celulă vegetativă. Rezistent la temperatură, radiații, substanțe chimice, sporul conservă timp îndelungat proprietățile genotipice şi fenotipice ale celulei vegetative din care provine. Două grupe majore de bacterii formează spori: genul aerob *Bacillus* şi genul anaerob *Clostridium*.

Poziția sporului în celulă reprezintă un criteriu de identificare şi clasificare a speciilor: centrală (*Bacillus abthracis*); subterminală (*B. cereus*); terminală (*Clostridium tetani*).

Structura sporului este aceeaşi (cu mici variații) la toate bacteriile (Fig.2.5):

a. – sporoplasma: conține elementele biologic active, sunt prezenți ribozomi şi ADN ;
b. – cortexul: conține acid dipicolinic, responsabil de rezistența sporilor;
c. – învelişurile sporale: trei straturi suprapuse: intina, exina, strat mijlociu;
d. – exospor: strat mucos de formă neregulată.

Diametrul sporului poate depăşi diametrul transversal al celulei şi deformează celula. Sporii deformanți sunt prezenți la bacteriile Gram-pozitive telurice, din genul *Clostridium* (Fig.2.6).

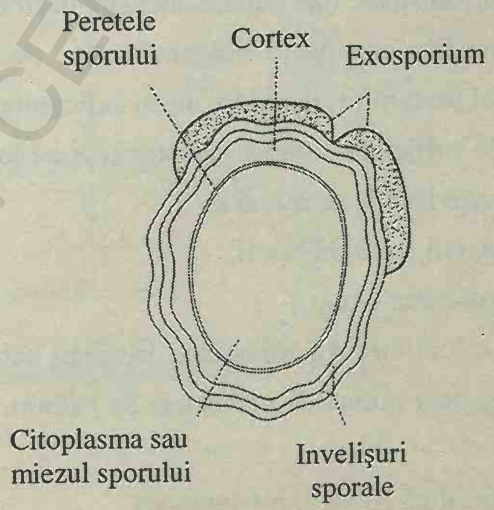
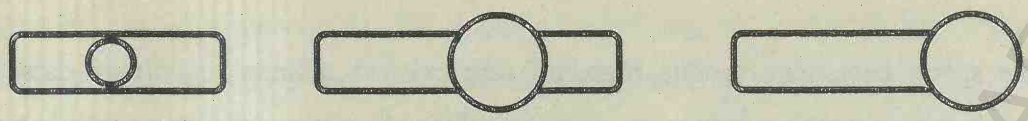


Fig.2.5 Structura sporului bacterian

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Spor central nedeformant (*Bacillus*)

Spor subterminal deformant (*Clostridium perfringens*)

Spor terminal deformant (*Clostridium tetani*)

Fig.2.6. Sporii bacterieni

Sporul conține în raporturi diferite, componenții prezenți şi în celula vegetativă. Caracteristică este prezența acidului dipicolinic care conferă termorezistență. Metabolic sporul este inert deoarece echipamentul enzimatic sărac este inactiv.

Sporul prezintă unele proprietăți care au importanță medicală:

- termorezistența – proprietate care se are în vedere la aplicarea sterilizării prin căldură;
- rezistența la antibiotice şi anumite antiseptice.

Clasificarea taxonomică şi nomenclatura bacteriilor

Taxonomia are ca obiect clasificarea sau divizarea organismelor în grupe ordonate.

Nomenclatura constă în etichetarea unui grup sau a membrilor individuali din grup.

Viețuitoarele au fost grupate în trei regnuri:

1. *Animal*
2. *Vegetal*
3. *Protista* – care include toate organismele unicelulare, inclusiv bacteriile.

Organismele superioare au fost clasificate filogenetic (ex. pe baza evoluției) dar această clasificare nu este posibilă în cazul bacteriilor, deoarece nu au suficiente caracteristici morfologice.

Clasificarea bacteriilor este artificială; diferite caracterisitci au fost alese arbitrar, astfel încât acestea să poată fi deosebite. Caracteristicile se referă la:

- morfologie, formă, dimensiuni, cili, capsulă, spori;
- colorabilitate (reacția față de coloratia Gram);
- caractere de cultură (aspectul coloniilor pe medii solide, în medii lichide, exigențe nutritive);
- reacții biochimice (capacitatea de a utiliza diverse surse de carbon, azot şi de a se dezvolta în aero sau anaerobioză);
- structura antigenică (reacția specifică cu ser imun omolog);
- compoziția de bază a ADN bacterian (ex. raportul guanină/citozină).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sunt recunoscute următoarele niveluri taxonomice: subspecia, specia, sub-genul, genul, sub-tribul, tribul, subfamilia, familia, subordinul, ordinul, subclasa, clasa. Specia bacteriană stă la baza întregii clasificări taxonomice: sunt incluse în aceeaşi specie bacterii care au o mare afinitate genetică, adică tulpini despre care se presupune că au o descendenţă ancestrală comună.

Speciile care au în comun un anumit număr de caractere sunt incluse în acelaşi gen; genurile aparţin unei familii, familiile comparabile în acelaşi ordin şi în continuare, până la grupele taxonomice de rang superior.Toate bacteriile sunt desemnate prin două nume latine, numele genului (scris cu majusculă), urmat de numele speciei (scris cu literă mică), de exemplu *Escherichia coli.*

Fiziologia şi creşterea bacteriană

Nutriţia bacteriană

Bacteriile, ca toate celulele au nevoie din mediul exterior, pentru a se menţine, creşte şi reproduce, de nutrienţi şi condiţii fizico-chimice favorabile.

Din punct de vedere chimic, bacteriile sunt constituite din: proteine, polisaharide, lipide, acizi nucleici, peptidoglican. Alimentele asimilate direct de bacterie, fără o digestie prealabilă sunt numite *nutrienţi.* Nutrienţii pătrund în celulă unde sunt transformaţi biochimic şi asigură necesităţile constitutive (materiale de construcţie) şi energetice (Fig.2.7).

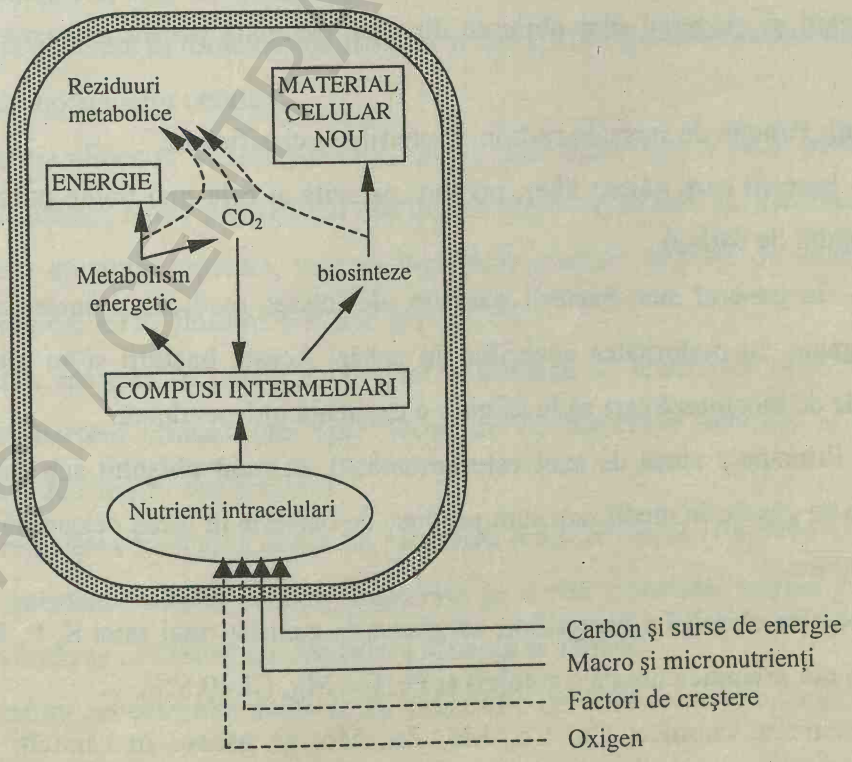


Fig.2.7 Nutriţia bacteriană şi metabolismul

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Necesitățile nutritive ale bacteriei

Compușii organici constituie majoritatea elementelor care intră în structura bacteriilor. Aceşti compuşi sunt sintetizați din elementele prezentate în Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Elementele esențiale necesare creşterii bacteriene

	Element	Utilizare
1.Elemente necesare sintezei compuşilor structurali	Carbon Hidrogen Oxigen Azot Fosfor Sulf	- pentru biosinteza glucidelor, lipidelor, proteinelor, acizilor nucleici
2.Elemente necesare pentru alte funcții celulare	Calciu Potasiu Magneziu Fier	Cationi majori; activează enzimele; rol esențial în formarea sporului Cofactor enzimatic; leagă enzimele se substrat Intră în componența mitocondriilor; rol în reacțiile de oxido- reducere
3.Microelemente	Cupru Cobalt Zinc Mangan Molibden	Activatori pentru o serie de enzime

Cele mai importante elemente sunt: hidrogenul, oxigenul, carbonul şi azotul.

Hidrogenul şi oxigenul sunt obținute din apă, esențială pentru creşterea şi supraviețuirea oricărei celule.

Carbonul. Funcție de sursa de carbon, bacteriile se clasifică în:

- auxotrofe - bacterii care trăiesc liber, nu sunt parazite şi cele mai multe utilizează ca sursă de carbon bioxidul de carbon.
- hetrotrofe – în general sunt bacterii parazite, de interes madical şi sursa de carbon este un compus organic, în majoritatea cazurilor un zahăr. Aceste bacterii şi-au pierdut o parte din mecanismele de biosinteză care să le asigure o existență independentă.

Azotul. Principala sursă de azot este amoniacul, în mod obişnuit sub formă de săruri de amoniu; acestea se găsesc în mediu sau sunt produse de bacterie în urma dezaminării aminoacizilor, obținuți din proteine.

În compoziția chimică a bacteriilor, se găsesc în cantități mai mici S, P, K, Na (fiecare în proporție de 1% din greutatea uscată a celulei) şi Fe, Ca, Mg, Cl, (0,5%).

Unele elemente chimice: Cu, Co, Mn, Zn, Mo, se găsesc în cantități extrem de mici (oligoelemente) şi îndeplinesc funcții de activare pentru unele sisteme enzimatice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Necesități constitutive specifice

Unele bacterii mai au nevoie de numeroşi compuşi organici care nu pot fi sintetizați de bacterie. Includerea unor compuşi numiți *factori de creştere* în mediul de cultură este indispensabilă pentru creşterea acestor bacterii numite *auxotrofe*, spre deosebire de *bacteriile prototrofe* care sunt capabile să sintetizeze toți constituienții care le sunt necesari, pornind de la compuşi minerali.

Factorii de creştere pot fi aminoacizi (necesari pentru numeroase specii bacteriene care nu-i pot sintetiza plecând de la elementele simple), baze purinice sau pirimidinice (precursori ai acizilor nucleici; sunt transformate în nucleoside şi nucleotide înaintea încorporării în ADN şi ARN), vitamine (numeroase bacterii patogene au pierdut capacitatea de a le sintetiza).

Necesitățile energetice

Metabolismul bacterian poate fi definit ca totalitatea reacțiilor biochimice prin care energia şi substanțele nutritive sunt luate din mediu pentru a fi utilizate în creştere şi biosinteza compuşilor proprii.

Reacțiile biochimice metabolice sunt de două tipuri: reacții prin care se eliberează energie (catabolism, dezasimilație) şi reacții prin care se consumă energie (anabolism, asimilație).

Creşterea celulei este rezultatul interdependenței dintre procesele catabolice şi anabolice: o parte din energia eliberată în urma catabolismului şi unii metaboliți intermediari sunt utilizați pentru biosinteza macromoleculelor celulare.

Din energia eliberată în reacțiile biochimice catabolice, doar o mică parte este utilizată în procesele de biosinteză. Rolul principal al reacțiilor catabolice, în care se eliberează energie, constă în formarea unor compuşi organici, care să înglobeze o mare cantitate de energie sub formă de legături macroergice: ATP, glucozo-6-P, acetil-CoA, etc.

Eliberarea energiei în cursul proceselor catabolice se realizează prin reacții chimice de oxido-reducere (bacterii chimiotrofe, spre deosebire de bacteriile fototrofe – fotosintetizante – pentru care sursa de energie este lumina).

Oxido-reducerea biologică constă în pierderea a doi electroni (frecvent doi atomi de H) din molecula unei substanțe numită donor şi transferul pe o altă moleculă, numită acceptor. Substanța care pierde electroni se oxidează, iar cea care îi acceptă se reduce.

După natura acceptorului final de H, procesele de oxido-reducere, prin care se eliberează energie la bacterii sunt:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Metabolismul fermentativ*, în care acceptorul final de electroni este un substrat organic şi se obţin câteva legături bogate în energie (ATP) prin fosforilarea la nivelul substratului. Principalul substrat supus fermentaţiei este reprezentat de hidraţii de carbon.
- *Metabolismul respirator* (respiraţia aerobă) – în care electronii eliberaţi prin oxidarea unor substraturi energetice sunt transferaţi, prin lanţul respirator citocromic membranar, oxigenului molecular, care este acceptorul final principal de hidrogen. În cursul respiraţiei se formează numeroase legături bogate în energie pe calea fosforilării oxidative.
- *Respiraţia anaerobă*, în care acceptorul final de H este o substanţă anorganică, alta decât oxigenul. Producerea de energie se face prin lanţul citocromic membranar, cuplat cu fosforilarea oxidativă, dar în absenţa unor compuşi oxigenaţi minerali (nitraţi, nitriţi, sulfaţi) sau a fumaratului.

Pătrunderea nutrienţilor în celula bacteriană

Nutrienţii pot fi asimilaţi direct, când sunt prezenţi în formă simplă (glucoză, acizi aminici, ioni) sau mai întâi degradaţi de enzimele extracelulare, dacă sunt sub forme complexe (proteine, polizaharide).

Un număr redus de molecule *difuzează liber* prin membrana citoplasmatică: gazele (O_2, CO_2), acizii graşi, nutrienţii solubili. Cea mai mare parte a nutrienţilor ajung în citoplasmă cu ajutorul *proteinelor de transport* (porine, permeaze).

Ajunse în celulă, aceste substanţe sunt metabolizate, sub acţiunea echipamentului enzimatic pe căile metabolice specifice fiecărei specii bacteriene.

Condiţiile de mediu care influenţează creşterea

Apa

Umiditatea este absolut necesară pentru creşterea tuturor bacteriilor: apa reprezintă 70-80% din greutatea celulei vegetative şi numai în prezenţa acesteia activează sistemele enzimatice şi este posibilă activitatea metabolică, creşterea şi multiplicarea.

Oxigenul

Bacteriile diferă în privinţa necesităţilor în oxigen molecular. Sub acest aspect se disting trei mari categorii de bacterii.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Bacterii cu metabolism respirator strict*, care nu pot supraviețui în absența oxigenului. Aceste bacterii cresc normal în prezența aerului (bacterii aerobe stricte: *Pseudomonas, Acinetobacter, Neisseria*) dar unele se dezvoltă mai bine sau numai când presiunea parțială a oxigenului este inferioară celei din aer (5% în loc de 20%) și se numesc bacterii microaerofile (ex. *Campylobacter*), (Fig.2.8 a, b).
- *Bacterii cu metabolism fermentativ strict* care nu utilizează oxigenul molecular pentru metabolismul energetic, dar cresc în prezența aerului (bacterii aerotolerante: streptococi, lactobacili) sau sunt omorâte în prezența acestuia: bacterii anaerobe stricte (*Bacteroides, Fusobacterium, Clostridium*), (Fig.2.8d).

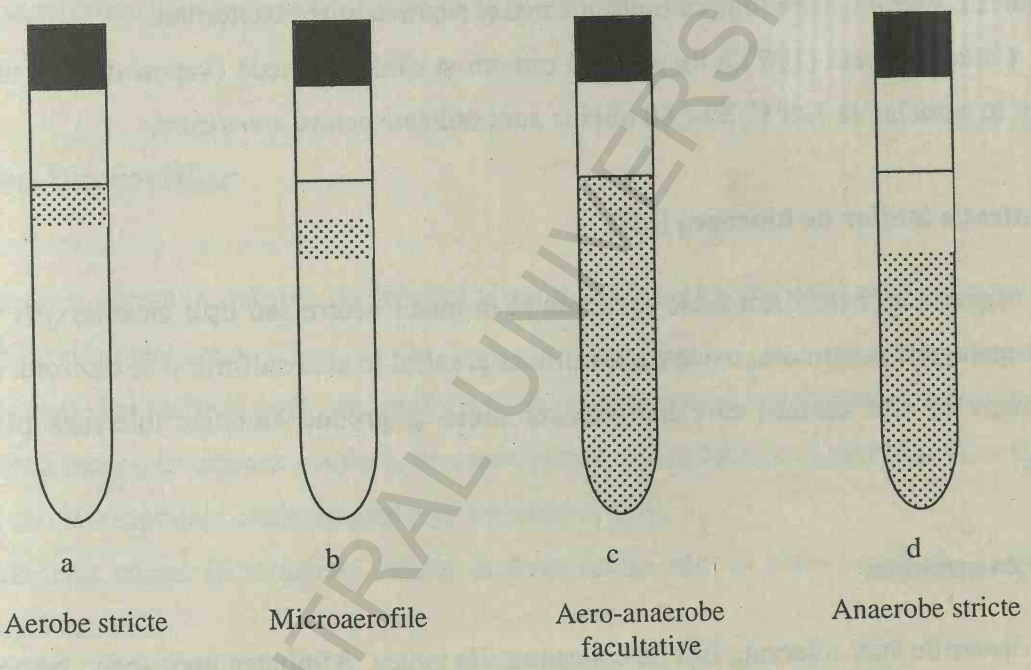


Fig.2.8 Cultivarea bacteriilor în prezența oxigenului

- *Bacterii cu metabolism respirator și metabolism fermentativ*, care pot creşte în prezența aerului, datorită respirației aerobe, sau în absența aerului, datorită fermentației și sunt numite aerobe – anaerobe facultative (enterobacterii, stafilococi), (Fig.2.8c).

Bioxidul de carbon

Este necesar pentru toate bacteriile și în mod obișnuit este disponibil în urma proceselor metabolice. La bacteriile care cresc greu sau sunt pretențioase nutritiv (bacterii fastidioase) bioxidul de carbon nu rezultă din metabolism și trebuie suplimentat din exterior. Numeroase bacterii patogene necesită cultivare în atmosferă cu 5 – 10% CO_2 (carboxifile).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Temperatura

Bacteriile diferă din punct de vedere al limitelor temperaturii optime de creştere:

- mesofile: optim între 20 – 40^{0}C;
- termofile: optim > 40^{0}C;
- psichrofile: optim < 20^{0}C;
- criofile: cresc la aproximativ 4^{0}C.

Bacteriile patogene pentru om sunt mezofile şi au temperatura optimă de creştere la aproximativ 37^{0}C. Totuşi, unele specii se pot dezvolta şi la 4^{0}C (*Listeria monocytogenes*). Rolul bacteriilor în alterarea produselor alimentare şi medicamentoase, nu trebuie neglijat. Temperaturile prea ridicate sunt incompatibile cu multiplicarea şi supravieţuirea bacteriilor.

Căldura uscată (180^{0}C) timp de 30 minute şi căldura umedă (vapori de apă sub presiune) obţinuţi în autoclav la 120^{0}C, 30 – 60 minute sunt utilizate pentru *sterilizare.*

Concentraţia ionilor de hidrogen (pH)

Majoritatea bacteriilor cresc preferenţial în medii neutre sau uşor alcaline (pH 7,5). Unele specii nepatogene pentru om, oxidează tiosulfatul şi sulful în acid sulfuric şi se dezvoltă la un pH de aproximativ 0, alte bacterii care hidrolizează ureea şi produc amoniac tolerează pH-uri foarte alcaline.

Presiunea osmotică

Bacteriile sunt tolerante faţă de concentraţiile ionice. Afinitatea unor specii patogene pentru NaCl este utilizată în obţinerea unor medii selective (ex. stafilococii). Sunt specii care pot cultiva în prezenţa unor concentraţii mari de NaCl (hiperhalofile) sau de zaharuri (zaharofile – contaminează în industria de medicamente, siropurile).

Radiaţiile

Radiaţiile solare, mai ales razele ultraviolete (UV) au proprietăţi bactericide, fiind considerate ca agenţi naturali importanţi de sterilizare.

Radiaţiile X şi Γ eliberează o mare cantitate de energie şi prin puterea lor mare de penetraţie, au efect bactericid puternic.

Radiaţiile UV au efect bactericid prin acţiunea asupra ADN, la nivelul căruia au loc reacţii fotochimice cu bazele purinice şi pirimidinice din structura acestuia.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Laserul, un fascicul foarte concentrat de fotoni, are o puternică acțiune bactericidă: concentrează pe o suprafață infimă, strict delimitată, o cantitate uriașă de energie. Sub acțiunea lui microorganismele sunt distruse instantaneu.

Ultrasunetele

Acționează prin fenomenul de cavitație: se creează cavități în continuitatea fazei lichide a citoplasmei în care gazele, activate de ultrasunete, realizează presiuni mari care rup membranele celulare.

Ultrasunetele inactivează virusurile şi toxinele bacteriene. Activitatea lor distructivă are utilizare în sterilizarea unor lichide termolabile sau în obținerea de vaccinuri.

Creşterea bacteriilor

Creşterea constă în mărirea coordonată a tuturor componenților unui organism, ca rezultat al adăugării de substanță nouă.

Creşterea bacteriilor, care se realizează prin depunerea substanțelor nou sintetizate, încetează când începe diviziunea celulară, fenomen inițiat de modificarea raportului între suprafața şi volumul celulei (suprafața creşte la pătrat iar volumul la cub).

Diviziunea constă în scindarea celulei în două celule fiice şi este precedată de replicarea cromosomului bacterian.

Mediile de cultură

Sunt suporturi de cultură nutritive sterile care asigură bacteriilor diverse elemente necesare creşterii: surse de C, N, oligoelemente, etc.

Clasificarea mediilor de cultură

a. După compoziție:

- <u>medii empirice</u>, derivate din bulion de carne, care asigură bacteriei un ansamblu nutritiv bogat. Adăugarea agarului, care topit rămâne lichid până la 45^0C, permite după răcire, obținerea unui

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mediu solid numit geloză nutritivă simplă. Geloza simplă, suplimentată cu diverşi compuşi (sânge, de ex.) permite creşterea bacteriilor exigente.

Adiționarea la mediul nutritiv a unor coloranți sau antibiotice, permite obținerea de medii selective, care au proprietatea de a inhiba creşterea anumitor specii. Sunt utilizate pentru izolarea unor specii bacteriene prezente într-un amestec bacterian. Astfel, mediul Martin conține un amestec de agenți antimicrobieni (vancomicină, colistină, fungiozină) care premite izolarea gonococilor din flora vaginală complexă.

- medii sintetice – compoziția lor este bine stabilită şi sunt utilizate pentru studiul metabolismului bacterian.

b. După utilizare:

- medii de izolare - sunt în general medii solide , pe care se etalează produsul microbian pentru a se obține coloniile diferențiate ale speciilor bacteriene prezente în amestec.
- medii de îmbogățire – medii lichide, în care bacteriile aflate în număr mic într-un produs patologic, se multiplică pentru a putea fi apoi izolate şi identificate.
- medii de identificare – permit studierea metabolismului unei bacterii, pe baza unei baterii de teste şi se poate face astfel identificarea (galeria biochimică de identificare).

Creşterea pe mediul solid

Bacteria, depusă pe suprafața mediului nutritiv, se multiplică şi formează colonia – formațiune vizibilă cu ochiul liber, care conține aproximativ 10^9 bacterii (corespunzător pentru 20 de generații).

Coloniile bacteriene pot avea trei aspecte principale: tip S (smooth: netede), tip M (mucoase) , tip R (rough: rugoase), (Fig.2.9 a, b, c).

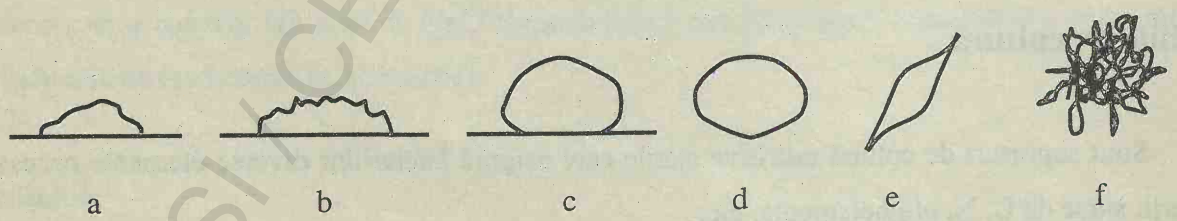


Fig.2.9 Tipuri de colonii

Dacă coloniile cresc în profunzimea mediului nutritiv agarizat, se obțin diferite forme: sferice (9d), bioconvexe (9e), pufoase (9f).

Aspectul diferit al coloniilor, permite diferențierea diferitelor specii dintr-un produs polimicrobian etalat pe un mediu agarizat (izolarea bacteriei).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Izolarea bacteriei pe geloză nutritivă se face prin epuizare: cu o buclă metalică (ansă) încărcată cu produsul patologic (inoculum) se eliberează pe suprafața mediului cantități tot mai mici, în cadrane, astfel încât în ultimul sector se obțin colonii izolate, provenite din multiplicarea unui singur individ (Fig.2.10).

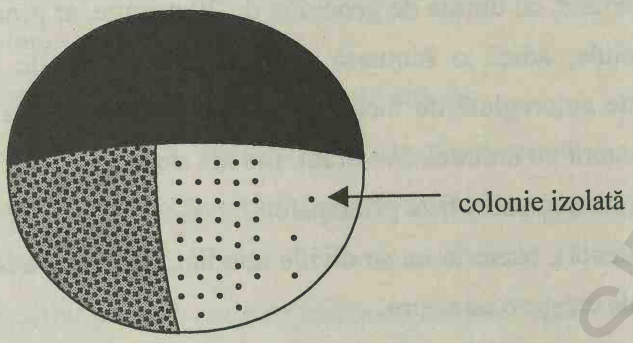


Fig.2.10 Metoda de inoculare în placă, pe mediu solid pentru obținerea de colonii izolate

Expresia matematică a creşterii

Creşterea unei populații (culturi) bacteriene se defineşte prin două constante:

a. *durata generației* (sau timpul dintre două diviziuni succesive);

b. *rata de creştere* (μ) sau numărul de diviziuni pe unitatea de timp (t).

În condiții optime de multiplicare, un anumit număr de celule (inoculum) va da:

- după o singură diviziune $a = 2 \times a$
- după două diviziuni $a = 2 \times 2 \times a$ $(2^2 \times a)$
- după n diviziuni $x = 2^n \times a$

Numărul de celule creşte exponențial (logaritmic) funcție de timp şi de numărul de diviziuni.

După n diviziuni, în timpul t, plecând de la un număr a de celule, se va forma un număr b de celule. Numărul de diviziuni n produse în intervalul t se calculează după formula:

$$n = (\log b - \log a) / \log 2$$

Dacă se cunoaşte valoarea lui n se poate calcula durata unei generații:

$$G = t/n$$

Valoarea lui G nu este identică pentru toate speciile (ex. pentru *Escherichia coli* G = 20 min., 27 ore pentru *Mycobacterium tuberculosis*; 10 – 20 zile pentru *Mycobacterium leprae*).

Rata de creştere se calculează după formula:

$$\mu = n/t$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Curba de creştere şi fazele creşterii

În mediu nereîmprospătat, populaţia bacteriană nu-şi poate menţine mult timp rata de creştere exponenţială, deoarece intervin doi factori limitanţi: epuizarea substanţelor nutritive din mediu şi acumularea produşilor toxici rezultaţi în urma activităţii metabolice.

Teoretic, o celulă bacteriană, cu durata de generaţie de 20 minute, ar produce în 48 de ore de creştere exponenţială 2^{144} celule, adică o biomasă de 2 x 10^{28} tone (de 4000 ori greutatea Pământului). Dar creşterea este autoreglată de factorii limitanţi, încât evoluţia ei se exprimă prin reprezentarea numărului de bacterii pe unitatea de volum, funcţie de timp.

La curba de creştere se disting patru faze principale:

A. *Faza de lag* (sau latentă); bacteria nu se divide imediat, deoarece trece printr-o perioadă de adaptare şi rata de creştere este zero.

B. *Faza de creştere exponenţială* (logaritmică), când creşterea nu este limitată de substrat, iar rata de creştere este maximă şi constantă.

C. *Faza staţionară*, când concentraţia substratului se diminuează şi devine limitantă pentru creştere. Rata de creştere este zero, curba este în platou iar cultura a atins densitatea maximă, cu un număr constant de celule viabile (Fig.2.11).

D. *Faza de declin*, numărul de celule scade, bacteriile moarte autolizează. Cultura sfârşeşte prin moartea tuturor celulelor şi autosterilizarea ei.

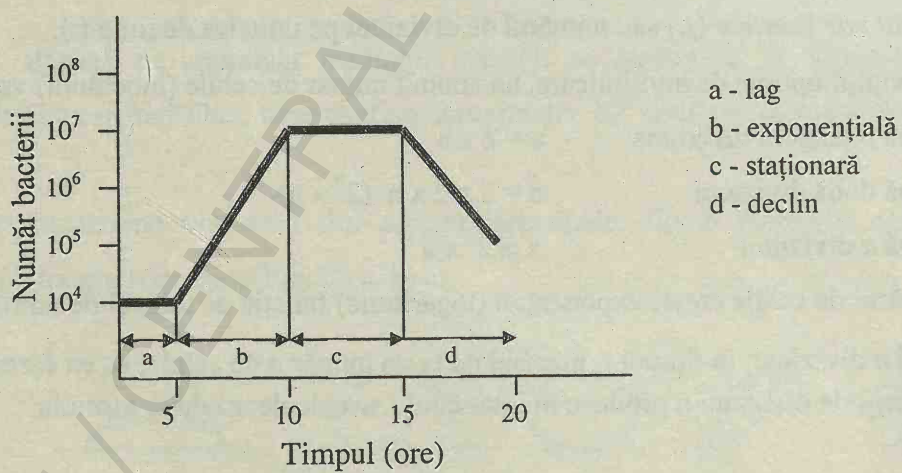


Fig.2.11 Curba de creştere a bacteriilor

Creşterea in vivo

În organismul uman creşterea bacteriilor este diferită de cea obţinută în culturi artificiale, în laborator. În general, rata de creştere in vitro este mult mai mare.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diverşi factori influenţează creşterea bacteriilor in vivo: media duratei unei generaţii, statusul nutriţional al pacientului, pH-ul, prezenţa metalelor (Fe, Ca) localizarea nutrienţilor, apărarea celulară şi umorală (imunoglobuline, complement), enzimele gazdei (proteaze, hialuronidaze).

Datele privind nutriţia, fiziologia şi creşterea bacteriană au aplicabilitate în diverse domenii:

1. În bacteriologie

- obţinerea de culturi pure, prin izolarea pe medii solide;
- elaborarea de medii de cultură, funcţie de exigenţele bacteriei (compoziţie, factori de creştere, oxigenare, etc.)sau medii selective (adiţionarea de antibiotice, antiseptice sau alte substanţe cu actiune inhibantă).
- identificarea bacteriilor printr-o serie de elemente caracteristice:
    a. tipul respirator (tulpini aerobe stricte, microaerofile, aerob anaerob facultative, anaerobe stricte) şi prezenţa enzimelor "respiratorii" – oxidaza, catalaza;
    b. metabolismul hidraţilor de carbon: acţiunea asupra substratului pe cale oxidativă sau fermentativă, producerea de metaboliţi intermediari, metabolismul azotului (producerea de enzime proteolitice, de hemolizine, etc).

2. *În antisepsie şi antibioterapie*

Variaţii ale creşterii bacteriene:

- inhibarea creşterii (bacteriostază) în prezenţa unor compuşii antibacterieni;
- distrugerea bacteriilor (efect bactericid) sub acţiunea agenţilor antimicrobieni.

3. *În sterilizare:* pentru distrugerea microorganismelor prin căldură, radiaţii UV, RX, RΓ, compuşi chimici (ex. formol).

4. *În stabilirea metodelor de conservare* a tulpinilor prin frig, congelare, liofilizare.

5. *În industria medicamentelor*:

- pentru dozarea microbiologică a vitaminelor şi a altor substanţe cu rol de factori de creştere pentru bacterii.
- pentru obţinerea de produse (antibiotice, enzime, aminoacizi), rezultate din metabolismul bacterian.

Bibliografie

Buchanan RE, Gibbons NE (eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, Baltimore, Williams and Wilkins, 1974.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Buiuc D. *Microbiologie Medicală*. Ed Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 79-93, 1992.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg HS. *Microbiology*, 4th edn, Philadelphia: JB Lippincott, 1990.

Marchal N. *Initiation a la microbiologie*, ed. Dunod, Paris, 95-112, 1992.

Zarnea G. *Tratat de Microbiologie Generală*, ed. Academiei Române, Bucureşti, v2, 325-384, 1983.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3

Proprietățile principalelor specii bacteriene

Cocii Gram pozitivi

Sub această denumire sunt grupate specii bacteriene a căror celulă este rotundă, imobile, Gram-pozitive:

- *Stafilococcus;*
- *Streptococcus;*
- *Diplococcus.*

Staphylococcus se prezintă sub formă de coci reuniți în grămezi, în perechi sau izolați, nu sunt mobili și nu formează spori. Cresc aerob, facultativ anaerob. Sunt prezenți în mediu (apă, aer, sol, alimente, mobilier, materiale) dar pot fi comensale și pe tegumentul și mucoasele organismului la om și la animale.

Stafilococii pot fi clasificați în:

- Stafilococi coagulazo-pozitivi: specia *Staphylococcus aureus*, condiționat patogenă, care produce un pigment galben și cauzează infecții supurative, septicemii, toxiinfecții alimentare cauzate de ingestia de alimente în care s-au dezvoltat și au eliberat toxine, conjunctivite, etc. *S. aureus* colonizează tranzitoriu narinele anterioare la 70-90% din indivizi.
- Stafilococi coagulazo-negativi sunt accidental patogeni, implicați în etiologia endocarditelor subacute la pacienți cu proteze valvulare cardiace, infecția articulațiilor protezate. Aparțin florei normale a pielii, membranelor mucoase și părții terminale a intestinului.
- *Streptococcus* cu celule așezate tipic în lanțuri mai mult sau mai puțin lungi, cultivă aerob, sau anaerob. Sunt prezenți în mediu (apă, sol, aer), comensali pe mucoasele și tegumentul omului și animalelor. Streptococii sunt microorganisme relativ pretențioase, necesitând medii îmbogățite pentru cultivare în laborator. Mulți dintre sterptococii asociați cu infecția umană produc o zonă de hemoliză completă în jurul coloniei bacteriene când sunt cultivați pe medii cu agar-sânge, aspect cunoscut ca beta-hemoliză. Streptococii beta-hemolitici pot fi clesificați după sistemul Lancefield, o clasificare serologică bazată pe reacția antiserurilor specifice cu antigenele peretelui celular bacterian. Alți streptococi produc o zonă de hemoliză parțială (alfa-hemoliză) – *S. pneumoniae*,

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

implicat în pneumonii, meningite. Streptococii viridans aparţin florei orlae normale şi sunt agenţi importanţi ai endocarditei bacteriene subacute.

- *Streptococcus pyogenes*, (streptococ de grup A) bacterie strict umană, cu localizare preferenţială la nivelul amigdalelor şi faringelui. Produce o serie de toxine, dintre care toxina eritrogenă, responsabilă de erupţia scarlatinoasă, şi enzime care distrug elementele componente ale sângelui (streptolizine, streptokinaze). *S. pyogenes* produce numeroase infecţii acute: angine bacteriene eritematoase, sinuzite, otite medii supurative, erizipel (dermită streptococică localizată frecvent la nivelul feţei şi gambelor) scarlatina. Febra reumatică şi glomerulonefrita acută pot surveni în urma infecţiilor streptococice. Infecţiile invazive streptococice pot cauza necroza ţesutului subcutanat (fasciite necrozante).
- *Diplococcus*.*S. pneumoniae* este aşezat caracteristic în perechi, lanceolaţi, capsulaţi, comensal la om pe mucoasa orofaringiană (purtători sănătoşi). În mediu nu supravieţuieşte. După penetrarea mucoasei rinofaringiene, se extinde pe cale hematogenă şi limfatică, determinând pneumonia acută lobară, meningite, peritonite, conjunctivite, infecţii invazive.
- *Enterococcus faecalis şi E. faecium* sunt patogeni pentru om, cauzând 10-20% din cazurile de endocardită subacută. Enterococii sunt frecvent izolaţi din infecţiile mixte care pornesc din flora intestinală (abcese intraabdominale şi din infecţiile polimicrobiene care au ca punct de plecare plăgile chirurgicale abdominale).

Cocii Gram – negativi

Neisseria

Cocii Gram-negativi patogeni aparţin genului *Neisseria*. Sunt aerobi strict, în formă de diplococi: celulele, cu aspect reniform, sunt aşezate faţă în faţă. Examenul microscopic evidenţiază prezenţa lor intracelulară. Cultivă pe medii cu sânge, la 35-37^{0}C, în atmosferă umedă, săracă în oxigen, cu un conţinut de 5-10% CO_2.

Gonococul (*Neisseria gonorrehoeae*), cu patogenitate strict umană, produce blenoragia; localizat ocular, determină oftalmia purulentă. *Neisseria meningitidis* este cauza meningitei meningococice.

Bacilii Gram-pozitivi

Genul *Bacillus*

Membrii acestui gen au răspândire largă: apă, aer, sol, produse animale. Sunt bacterii sporulate aerobe, cu numeroase specii inofensive pentru om şi animale.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacillus anthracis este un patogen periculos care produce la om şi animale antraxul. Boala, la om se manifestă sub trei forme: cutanată (pustule localizate în general pe mâini, ca boală profesională, la cei care manipulează piei, lână, carnea animalelor infectate) pulmonară şi gastro-intestinală (mai rare). Este un bacil mare, imobil, incapsulat, aerob, dispus în lanţuri, cu spor oval, central. Sporii de *B. anthracis* pot supravieţui ani de zile în sol, dar sunt distruşi prin fierbere timp de 10 minute, prin tratare cu agenţi oxidanţi (permanganat de potasiu, peroxid de hidrogen).

Bacillus cereus este implicat în "intoxicaţiile" alimentare ca urmare a proliferării masive a bacteriei în alimentul contaminat: orez, preparate pe bază de carne sau vegetale.

Alte specii produc antibiotice: *B. polymyxa*: polimixinele; *B. brevis*: tirotricina; *B. licheniformis, B. subtilis*: bacitracina.

Genul *Clostridium*

Speciile care aparţin acestui gen sunt anaerobe, sporulate (spori cu rezistenţă mare la factorii fizico-chimici), prezenţi în sol, pe vegetale.

Numeroase specii sunt patogene prin toxinele proteice produse. Pătrund în organism prin leziunile tegumentului, mucoaselor, sau prin ingestia de toxine.

Clostridium septicum, Cl. perfringeus produc distrugeri ale ţesuturilor când se multiplică în răni unde condiţiile sunt prielnice: anaerobioză, pH acid. În activitatea metabolică a bacteriei se produce CO_2 care disociază fibrele musculare (gangrena gazoasă).

Clostridium tetani este agentul tetanosului, o afecţiune neurologică caracterizată prin tonus muscular crescut şi spasme, care este cauzată de tetanospasmină, o toxină proteică puternică elaborată de bacterie. Este un comensal obişnuit în tubul digestiv al multor specii de animale (equide şi bovine în special). Eliminat prin fecale, sporulează şi persistă în sol. Sporii sunt rezistenţi la dezinfectante şi la fierbere timp de 30 de minute. Bacteria rămâne localizată şi se multiplică la locul de inoculare (diverse plăgi) dar toxina tetanică elaborată este răspunzătoare de simptomatologie: trismus (contracţii dureroase ale muşchilor masticatori, contracţii generalizate permanente; moartea survine prin asfixie în cursul unui spasm laringian). Boala poate fi prevenită prin imunizare. Revaccinarea este necesară la fiecare 10 ani.

Clostridium botulinum produce o toxină care acţionează la nivelul sistemului nervos periferic şi consumul de alimente în care bacteria s-a multiplicat, este fatal.

Intoxicaţia se manifestă prin paralizii oculare, buco-faringiene, ale muşchilor scheletici. Manifestările grave pot duce la deces în 24 ore. Perioada de incubaţie este de 18-36 ore, dar funcţie de doza ingerată, poate varia de la câteva ore la câteva zile. In botulismul alimentar, antitoxina ecvina trivalentă trebuie administrată cât mai rapid.

BUAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacteria formează spori subterminali, se găseşte în sol, în mediul acvatic şi elaborează cea mai puternică toxină bacteriană cunoscută.

Clostridium sporogenes nu este patogen şi este utilizat un microorganism test pentru controlul mediilor de cultură anaerobe.

Clostridium difficile are ca habitat intestinul uman şi cauzează colite pseudo-membranoase care survin în urma terapiei cu antibiotice, mai ales ampicilina, clindamicina, cefalosporine. Dismicrobismul provocat de aceste antibiotice asupra florei intestinale, permite multiplicarea bacteriei care produce toxina (citotoxina). Administrată per os, vancomicina este eficientă asupra *Clostridium difficile.*

Genul *Corynebacterium*

Genul reuneşte numeroase specii unele patogene pentru om şi animale, altele comensale, prezente pe tegumente şi mucoase.

Corynebacterium diphterie, specie prezentă doar la om, localizată pe orofaringele persoanelor bolnave, cauzează difteria, boală eradicată în cea mai mare parte prin vaccinare cu antitoxină difterică.

Este un bacil fin, Gram-pozitiv, cu extremităţile umflate, imobil, dispus în grupe caracteristice (litere chinezeşti) sau linii paralele (palisade). Produce toxina difterică cu acţiune necrozantă locală. Pe cale sanguină, toxina ajunge la organele principale: rinichi şi suprarenale, ficat, sistem nervos, inimă, unde se fixează şi blochează sinteza proteică celulară. Prin tratarea toxinei difterice cu formaldehidă se obţine un produs netoxic: toxoidul difteric. Imunizarea cu toxoid duce la formarea de anticorpi care neutralizează toxina şi previn difteria.

Genul *Listeria*

Listeria monocytogenes, saprofit, prezent în apă, sol, pe vegetale, în materii fecale, rezistent la agenţii fizico-chimici şi uscăciune. Poate supravieţui 1-2 ani în sol şi câţiva ani în prelevate menţinute la 4^0C. Omul şi animalele sunt purtători sănătoşi. Contaminează produsele lactate, carnea. Este un bacil Gram-pozitiv mic, care supravieţuieşte şi se multiplică la temperaturi scăzute ($3 - 4^0$C) (psichrophilie)şi la un pH de 4,5-9,6 (pH optim: 7,4).

De aceea trebuie avut în vedere ca temperatura din camerele frigorifice să aibă valori mai scăzute pentru a preveni creşterea bacteriei.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Microorganismul poate să adere pe diferite suporturi şi formează biofilme, ceea ce face dificilă eradicarea acestuia.

Contaminarea omului este digestivă, plecând de la produse alimentare contaminate. Infecția de manifestă prin meningite, meningo-encefalite, septicemii. Este un patogen intracelular care determină boala cu predilecție la persoane cu deficit al imunității celulare.

In ultimii 12 ani, în America de Nord şi Europa au fost înregistrate numeroase epidemii.

Bacilii Gram negativi

Genul *Pseudomonas*, cuprinde numeroase specii, majoritatea saprofite, prezente în sol, aer, apă, plante, animale, om. Colonizează ocazional tegumentul, urechea externă, tractusul respirator superior sau intestinul gros la persoane sănătoase.

Pseudomonas aeruginosa, prezent frecvent în mediul de spital, este responsabil de infecții ale plăgilor, mai ales arsurilor. Este aerob strict şi se dezvoltă la temperaturi de 10 – 41^{0}C. Determină infecții grave la pacienții imunodeprimați. De asemenea cauzează infecții respiratorii, osoase şi articulare, gastrointestinale, tegumentare, oculare, urinare, meningite. Au fost identificate numeroase rezervoare potențiale: echipamente respiratorii, soluții dezinfectante, endoscoape, bazine de fizioterapie, chiuvete.

Pseudomonas aeruginosa este rezistent la numeroşi agenți antibacterieni şi poate utiliza diferite dezinfectante ca surse nutritive. Antibioticele cu activitate antipseudomonas includ aminoglicozide, unele cefalosporine de generația a treia, anumite peniciline cu spectru larg şi fluorochinolone.

Genul *Vibrio*

Vibrio cholerae este agentul cauzal al holerei boală prezentă în Asia, mai ales în India, de unde, în secolul al XIX-lea s-a răspândit în toată lumea. Este un bacil Gram negativ cu aspect caracteristic de virgulă şi un flagel polar care îi asigură mobilitatea. Holera este o boală diareică acută, care, în câteva ore, poate duce la deshidratare rapid progresivă şi moarte.

Se dezvoltă în apă şi contaminarea poate fi prevenită prin fierberea apei şi consumarea hranei preparate termic. Omul se contaminează pe cale orală, prin consum de alimente contaminate sau mîini murdare cu excrete patologice (fecale, vomismente).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vibrio cholerae poate supraviețui timp îndelungat în natură, în apele dulci, sau sărate, în climat rece sau tropical. Moluștele și crustaceele contaminate sunt un rezervor acvatic important. Proliferează în lunile de vară, când temperatura apei depășește 20^0C.

Francisella tularensis produce tularemia la om, rezervorul bacterian este reprezentat de mamifere mici (șobolani) dar și de câini, pisici, iepuri.

Dimensiunile bacilului sunt foarte mici. Omul se contaminează mai ales prin manipularea animalelor bolnave. Bacteria străbate ușor tegumentul și mucoasele.

Genul *Brucella*

Aceste bacterii produc brucelosele, infecții ale animalelor care se transmit la om (antropozoonoze). Infecțiile umane apar ca urmare a contactului cu un animal infectat sau prin ingestia de lapte sau carne infectate.

Bacilii, de dimensiuni reduse, se multiplică intracelular la nivelul ganglionilor, unde ajung pe cale limfatică, și apoi trec în circulația generală. Manifestarea cea mai frecventă este bruceloza acută septicemică cu febră ondulantă, hepatomegalie, astenie cu o durată medie de 2 – 4 luni.

Genurile *Flavobacterium și Acinetobacter*

Diferitele specii ale acestor genuri sunt prezente în sol, apă și contaminează produsele farmaceutice. *Flavobacterium* este pigmentat.

Genul *Haemophilus*

Cuprinde bacili mici, Gram negativi, care nu cresc decât în prezența unor factori conținuți în sânge, hemină și/sau nicotinamid-adenin-dinucleotid care trebuie adăugat la mediile de cultură.

Haemophilus influenzae este cauza principală a meningitelor și conjunctivitelor infantile ca și a bronșitelor acute și cronice la adult. Suprainfecțiile secundare complică gripa, boală virală deja instalată (*influenzae*: de unde și denumirea).

Genul *Bacteriodes*

Membrii genului sunt anaerobi și sunt prezenți în tractusul digestiv al omului și animalelor. Sunt asociați cu infecțiile plăgilor, mai ales după intervenții chirurgicale. *Bacteriodes fragilis* este cel mai frecvent implicat în infecții. Este prezent mai ales în colon.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Genul *Campylobacter*

Cuprinde bacterii responsabile de infecții intestinale. Sunt bacili curbați în formă de virgulă sau S, Gram negativi, mobili, cu un singur cil polar, microaerofili sau anaerobi. Nu se dezvoltă la temperaturi mai mici de 30^0C. *Campylobacter* este prezent în tractusul digestiv al multor animale folosite în industria alimentară şi a animalelor de casă.

Campylobacter jejuni determină la om enterocolite şi se transmite prin hrană contaminată sau prin contact direct cu animale contaminate.

Genul *Helicobacter*

Helicobacter pylori este cauza unor gastrite şi ulcere gastrice.

Enterobacteriile

În acest grup sunt incluse microorganisme, denumite enterobacterii deoarece au habitat în intestinul omului şi al animalelor. Mai pot fi găsite în sol, aer, apă, alimente (unde ajung prin contaminare fecală).

Din punct de vedere al patologiei umane, se grupează în:

- *Bacterii patogene specifice*, care produc infecții ca urmare a unei igiene defectuoase şi contaminarea se face direct sau prin intermediul unui vector (alimentar sau animal). Aici se încadrează: *Salmonella, Shigella, Yersinia.*
- *Bacterii patogene oportuniste* care provin din flora digestivă comensală, rezidentă normal în tubul digestiv. Acestea mai pot proveni şi din flora saprofită, abundentă în sol, ape, resturi vegetale, unde participă la circuitul degradării materiei organice. Prin contaminarea produselor alimentare pot cauza infecții (*Serratia, Proteus*).

Enterobacteriile sunt bacili Gram negativi asporulați, imobili sau mobili; unele specii sunt capsulate. Studiul caracterelor biochimice permite identificarea enterobacteriilor şi încadrarea în genuri şi specii.

Genul *Escherichia*

Escherichia coli reprezintă 80% din flora intestinală aerobă a adultului. În mediu sau pe alimente este prezent ca urmare a contaminării fecale. Produce enterite la copii şi frecvent infecții urinare spontane sau după instrumentații. Este o cauză majoră a gastroenteritelor celor care

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

călătoresc. *Escherichia coli* enterotoxigen este o cauză a diareei turiştilor care apare la persoane anterior sănătoase, în cursul vizitării unor regiuni tropicale sau subtropicale cu condiţii igienice precare. Bacteria se transmite pe cale fecal-orală, de obicei prin contaminarea apei sau legumelor. *E. coli* enteroinvaziv produce boala asemănătoare dizenteriei; *E. coli* enterohemoragic produce colita hemoragică.

Genul *Salmonella*

Salmonella poate fi prezentă în tubul digestiv al omului sau animalelor bolnave sau al purtătorilor sănătoşi şi, prin fecale, contaminează mediul exterior. Boala se produce prin consumul de apă sau alimente contaminate cu fecale (contaminarea oro-fecală). Infecţia se manifestă variat: febra tifoidă, infecţii sistemice , septicemii, gastroenterite.

Genul *Shigella*

Bacterii specific patogene ale tubului digestiv, nu sunt prezente decât la om şi se transmit oro-fecal. *Shigella shiga, Shigella flexneri, Shigella sonnei* şi *Shigella boydii* produc dizenteria bacilară.

Genul *Yersinia*

Cuprinde trei specii: *Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudo-tuberculosis* şi *Yersinia pestis.*

Yersinia enterocolitica are răspândire largă în sol, apă, la păsări şi mamifere mici. Bacteria este cauza enterocolitelor de origine alimentară, omul se contaminează prin consum de legume crude, carne, contaminate.

Yersinia pestis este un bacil prezent la şobolani şi alte rozătoare. Contaminarea altor animale şi a omului se face prin puricii şobolanului sau prin manipularea cadavrelor contaminate.

Pesta umană are două forme*: pesta bubonică* (cea mai frecventă infecţie a sistemului limfatic) care poate evolua spre septicemie (ciuma neagră) şi în absenţa tratamentului, survine moartea; *forma pulmonară*, care apare după inhalarea de particule infecţioase, cu evoluţie rapid mortală în absenţa tratamentului. Focare endemice sunt în Iran, India, Africa, URSS.

Genul *Proteus*

Sunt bacterii saprofite, răspândite în sol, ape, de asemenea sunt prezente în tubul digestiv, pe tegumente. Descompun ureea în CO_2 şi amoniac. *Proteus* poate contamina arsurile, plăgile chirurgicale şi este asociat cu infecţiile cronice distructive ale urechii medii şi mastoidei.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteus vulgaris poate cauza infecţii ale tractusului urinar. Sub acţiunea ureazei produse, ureea este transformată în hidroxid de amoniu, cu creşterea pH-ului urinar la valori care favorizează formarea calculilor. Aceşti calculi obturează căile urinare şi duc la persistenţa infecţiei şi distrugerea parenchimului renal.

Genul *Klebsiella*

Este saprofit cu răspândire largă în natură, dar poate fi şi comensal în tubul digestiv şi în căile respiratorii superioare. Sunt bacili Gram negativi, imobili, capsulaţi.

Klebsiella pneumoniae poate cauza bronhopneumonii acute, infecţii urinare, în sfera O.R.L., septicemii. In spital, *Klebsiella* este o cauză majoră a infecţiilor urinare, ale tractusului respirator inferior, tractusului biliar, plăgilor chirurgicale.

Genul *Serratia*

Serratia marcescens are dimensiuni foarte mici (0,5 - 1μm lungime) şi este utilizată pentru testarea filtrelor bacteriene. Nu este patogenă şi infecţiile pe care le poate cauza sunt rare.

Genul *Legionella*

Legionella pneumophila este dintre alte 16 specii ale genului, cea mai importantă pentru medicină. Aceste bacterii, patogene pentru om, produc pneumopatii acute.

Sunt prezente în numeroase rezervoare de apă dar mai ales în circuitele de distribuţie a apei potabile reci şi calde şi în sistemele de climatizare. Anumite amibe şi protozoare ciliate ingeră legionelele şi favorizează multiplicarea lor intracelulară, protejând bacteria de dezinfectanţi şi alţi factori neprielnici.

Se dezvoltă bine la temperaturi de 35-45^{0}C, în prezenţa resturilor organice şi minerale sau provenite de la alte microorganisme.Garniturile de cauciuc deteriorate şi izolatoarele instalaţiilor de apă favorizează creşterea bacteriei.

Bacilii acido-alcoolorezistenţi

Genul *Mycobacterium*

Include bacili asporulaţi imobili, care nu pot fi puşi în evidenţă prin coloraţia Gram. Coloraţi cu fucsină, la cald, reţin colorantul după tratamentul cu un acid diluat şi alcool. După supracolorare

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu albastru de metilen, mycobacteriile apar roşii pe fond bleu. Această colorație (Ziehl-Neelsen) pune în evidență proprietatea fundamentală a mycobacteriilor legată de prezența lipidelor în peretele celular: acido-alcoolorezistența (AAR).

Mycobacterium tuberculosis este patogen specific pentru om dar poate infecta şi animalele care trăiesc în preajma lui. Este foarte sensibil la unii agenți fizici: căldură, raze UV. Rezistă bine la frig şi uscăciune. În produsele contaminate poate rezista mult timp. Tuberculoza este o infecție cronică, caracterizată prin formarea de granuloane în țesuturile infectate şi prin hipersensibilitate mediată celular. Localizarea uzuală este pulmonară, dar pot fi afectate şi alte organe. Transmiterea se face pe cale respiratorie. Bacilii sunt răspândiți cu picăturile de lichid eliminate prin tuse, strănut, vorbire. Picăturile se evaporă şi bacilii deshidratați rămân în aer perioade lungi. Infectarea are loc prin inhalarea bacililor.

Mycobacterium leprae este un patogen specific strict uman, care produce lepra; nu poate creşte pe medii artificiale. Lepra (boala Hansen) este o infecție granulomatoasă cronică care afectează țesuturile superficiale, mai ales pielea şi nervii periferici. Bacilul se multiplică foarte lent, cu un timp de generație de 11-13 zile. Boala este mai frecventă în țările tropicale: 1-2% din populație.

Spirochetele

Sunt bacterii de formă spiralată, flexibile şi mobile, datorită fibrilelor interne. Nu pot fi colorate prin tehnica Gram; examenul lor se face în stare vie, la microscop cu fond întunecat.

Genul *Treponema*

Treponema pallidum este agentul sifilisului, boală cronică strict umană, cu transmitere exclusiv sexuală. Penetrează rapid membranele mucoase intacte sau pielea lezată şi în câteva ore trece în sânge şi în vasele limfatice; infecția sistemică şi focare metastatice apar cu mult înaintea leziunii primare (şancrul primar).

Genul *Borrellia*

Paraziți ai omului, ai unor păsări, mamifere şi artropode hematofage, borrelliile cultivă în anaerobioză,pe medii complexe;la microscopul cu fond negru apar ca spirochete cu lungimea de 8-18μm.

Borrellia recurentis se transmite prin păduchi la om şi produce febra recurentă care se

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

caracterizează prin accese febrile (40-41^{0}C) de 5-7 zile, urmate de perioade afebrile de 3-10 zile, care se repetă de 3-5 ori. În perioadele afebrile bacteriile se multiplică în viscere (ficat, creier, splină).

Borrellia burgdorferi, prezentă la mamifere şi păsări sălbatice, se transmite prin căpuşe şi determină boala Lyme, cu evoluţie stadială: leziuni cutanate, apoi septicemie şi în ultima fază, leziuni cardiace, nervoase, artrite.

Genul *Leptospira*

Leptospirele sunt larg răspândite în natură şi pot infecta numeroase specii de animale (zoonoze). La om pot cauza accidental infecţii, dintre care cea mai gravă este leptospiroza ictero-hemoragică.

Rezervorul natural este reprezentat de şobolani dar şi de animalele domestice: câine, cal, porc, bovine.

Animalele infectate elimină în număr mare bacteria prin urină şi fecale şi contaminează mediul exterior.

Au formă spiralată, fină şi flexuoasă, foarte mobil examenul se face la microscopul cu fond negru.

Rickettsii

Genul *Rickettsia*

Rickettsiile sunt bacterii cu dimensiune foarte mică (0,25-0,3μ) şi structură asemănătoare bacteriilor Gram negative. În laborator pot fi cultivate pe culturi de celule sau prin inocularea animalelor de laborator. Sunt bacterii parazite intracelulare obligatorii.

Rickettsia prowazeki este agentul tifosului exantematic; rezervorul este omul iar vectorul, păduchele de corp.

Rickettsia typhi este transmisă de la şobolan prin purici. Boala este endemică în Grecia şi U.S.A.

Chlamidiile

Chlamidiile sunt bacterii mici care nu se pot dezvolta decât în citoplasma unei celule gazdă. Celula are peretele de tip Gram negativ, se reproduc printr-un ciclu complex şi sunt inactivate de

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

antibiotice active asupra bacteriilor.

Chlamidia trachomatis produce o serie de infecţii umane (conjunctivite, uretrite non-gonococice).

Chlamidia psittaci. Rezervorul de germeni este reprezentat de păsări de agrement (papagali) şi domestice (găini, curcani), mamifere (ovine, bovine) care contaminează omul.

Boala produsă se numeşte psittacoză sau ornitoză. Bacteria pătrunde pe cale respiratorie, se multiplică în plămân, determinând o pneumonie gravă.

Bibliografie

Buiuc D. *Microbiologie Clinică.* Ed Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 167-407, 1998.

Hovelius B, Mardth PA. *Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections.* Rev Infect Dis: 6: 328-337, 1984.

Peter G, Smith AL. *Group A streptococcal infections of the skin and pharynx.* N Engl J Med, 297: 311-317, 1977.

Sneath PHA, Mair GS, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, V2, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4

Genetica bacteriană

Rolul acizilor nucleici în ereditate a fost stabilit de Avery încă din 1944. A fost demonstrat că toate sistemele biologice cu excepția virusurilor conțin două tipuri de acizi nucleici, acidul dezoxiribonucleic (ADN) şi acidul ribonucleic (ARN), precizându-se rolul lor în ereditate şi variabilitate.

Genetica bacteriană studiază ereditatea şi variabilitatea bacteriană. Molecula de ADN, care conține informația ereditară, se transmite prin replicare şi diviziune la descendenți.

Un segment al ADN – *gena* – determină sinteza unui anumit polipeptid. Toate genele reprezintă *genomul*. Totalitatea informației genetice a bacteriei reprezintă *genotipul* iar totalitatea caracterelor exprimate – *fenotipul*.

Genomul bacterian

Genomul bacterian este alcătuit din două categorii de determinanți genetici:

1. Cromosomali (cromosomul bacterian);
2. Extracromosomali (plasmide, transpozoni).

Cromosomul bacterian care deține toată informația genetică necesară pentru existența celulei, este alcătuit dintr-o moleculă de ADN dublu helicală circulară. Are lungimea de aproximativ 1mm, este lipsit de membrana nucleară şi vine în contact cu membrana celulară la nivelul mesosomilor (Fig.4.1).

Componentele structurale ale AND

ADN (ca şi ARN) este un polimer nucleotidic, constituit din unirea unui număr mare de unități structurale de bază, numite *nucleotide*.

Nucleotidul este alcătuit din: 1) o bază purinică (adenină, guanină) sau pirimidinică, (citozină, timină); 2) o pentoză (dezoxiriboză); 3) un rest de fosfat anorganic (acid fosforic sub formă de ortofosfat).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

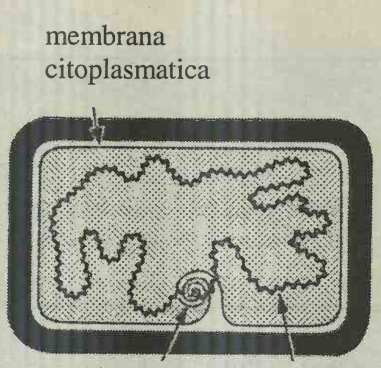


Fig.4.1 Genomul bacterian

Fiecare aminoacid este codificat de o secvență de trei baze azotate numită *codon*. Codul genetic este universal (un triplet de baze codifică invariabil același aminoacid dar și degenerat, deoarece același acid aminic poate fi codificat de mai multe triplete). Secvența bazelor ADN conține informația genetică și determină așezarea acizilor aminici în molecula proteică.

Structura primară a ADN (monocatenară) rezultă din succesiunea specifică a celor patru mononucleotice principale între care se stabilesc legături covalente fosfodiester; se pot forma catene lungi lineare, în care succesiunea specifică a celor patru baze azotate (A, T, C, G) asigură codificarea informației genetice.

Structura secundară a ADN rezultă din ansamblarea a două catene polinucleotidice. Modelul structurii dublu helicale a ADN, elaborat de Watson și Crick (1953) are la bază două carcateristici fundamentale;

1.Complementaritatea: secvența bazelor dintr-o catenă este specifică, adică determină în mod absolut secvența bazelor în catena opusă, astfel încât cele două catene au în mod obligatoriu secvențe complementare. Cele două catene polinucleotidice sunt menținute împreună prin legături de hidrogen, între perechi riguros specifice: A – T (sau T – A) și G – C (sau C – G).

Semnificația complementarității bazelor. Conceptul complementarității reprezintă particularitatea cea mai importantă a moleculei dublu helicale de ADN și elucidează atât mecanismul de replicare cât și capacitatea de transmitere a informației.

2.Legăturile fosfodiester (3'– 5') sunt orientate între cele două catene cu polaritate opusă; catenele merg în direcții opuse, sunt antiparalele una față de alta (Fig.4.2).

Replicarea ADN este un proces biochimic prin care secvența bazelor din fiecare dintre catene, după desfacerea legăturilor intercatenare de H, dictează secvența bazelor din catenele complementare încât în celulele fiice, după diviziunea celulei se transmit copii identice ale genomului celulei-mamă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

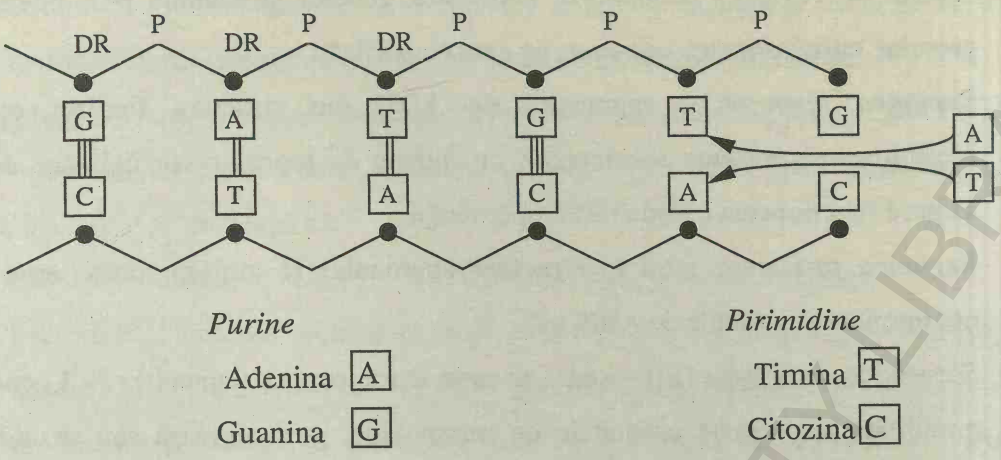


Fig.4.2 Schema unui segment de AND dublu catenar; direcțiile de replicare a AND

Transcrierea şi traducerea genetică este o altă funcție specifică a ADN care serveşte ca matriță pentru ARN mesager (ARNm): transcrierea informației genetice, conținute în nucleu, la ribosomi, unde informația este tradusă într-o proteină.

Microorganismele prezintă o variabilitate accentuată care poate fi: fenotipică şi genotipică.

Variațiile fenotipice (variații adaptative, fiziologice) sunt induse, netransmisibile la descendenți. Sunt provocate şi reprezintă un răspuns direct la diversele condiții de mediu. De exemplu, *Serratia marcenscens* cultivată la 37^0C nu pigmentează, dar pigmentul se formează la 25^0C; inducerea formării de beta – galactozidază, care degradează lactoza, prin adiționarea lactozei în mediul de cultură.

Variațiile genotipice apar fie prin recombinarea genetică (încorporarea de material genetic exogen), fie prin *mutație* fenomen spontan sau indus, care constă în adăugarea, pierderea, substituirea sau inversarea unor baze în secvențele polinucleotidului. Variațiile genotipice afectează doar un număr mic de indivizi dintr-o populație şi se transmit ereditar.

Materialul genetic este protejat de pătrunderea ADN străin din exterior, prin acțiunea distrugătoare a *endonucleazelor de restricție*. De asemenea, există şi mecanisme eficiente de reparație a ADN, prin care se corectează erorile apărute în urma replicării imperfecte sau a mutațiilor.

După funcțiile îndeplinite, în structura cromosomului se găsesc mai multe tipuri de determinanți genetici:

- Genele structurale (90% din informația genetică) – determină structura primară a proteinelor (ordinea aminoacizilor) şi sunt grupate în unități numite *operoni*, împreună cu genele de reglare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Genele de reglare* controlează activitatea genelor structurale prin intermediul unei proteine citoplasmatice *represor*, pe care o codifică;
- *Regiunea operator* – segmentul de ADN din structura fiecărui operon, care recepționează prezența substanțelor cu funcție de represor sau inductor din mediu şi asigură funcționarea coordonată a operonului.
- *Regiunea promotor*, intră în structura operonului şi inițiază transcrierea genetică a operonului în molecule de ARN m.
- *Secvențele de inserție* (SI) – sunt secvențe scurte care corespund la 1- 2 gene şi datorită mobilității au o mare capacitate de transpoziție: se integrează sau se eliberează din anumite situsuri de pe cromosom sau plasmide. Pot delimita diferite gene structurale cu care formează elemente genetice transpozabile numite *transpozoni* care se pot muta de la un situs la altul pe acelaşi genom sau pe genomuri diferite;
- *Pe cromosomul bacterian* mai sunt 10–20 gene care codifică sinteza ARNt (transportor). Mai conține gene care controlează replicarea şi suprafețe de legare cu mezosomul.

Plasmidele

Plasmidele sunt molecule de ADN extracromosomal circulare, dublu catenare, capabile de replicare independentă de cromosom.

Mai mici decât cromosomul, conțin informație genetică neesențială pentru creşterea celulei, încât pot fi dobândite sau pierdute, fără a afecta viabilitatea acesteia. În celula bacteriană pot fi prezente mai multe copii ale aceleaşi plasmide. De asemenea plasmide diferite se găsesc în aceeaşi celulă; în mod obişnuit, 1–2 plasmide (uneori mai multe) diferite pot coexista în aceeaşi celulă bacteriană.

Tipurile de plasmide

Plasmidele sunt denumite şi clasificate după efectul produs asupra celulei fertilitate, colicinogeneză, rezistență la antibiotice, etc.

Funcție de capacitatea de a media transferul de material genetic prin conjugare, plasmidele se grupează în:

1.Plasmide conjugative (transmisibile sau infecțioase) sau factori de sex, care controlează stabilirea stării de donator de material genetic şi apariția unor caractere (ex. pilii de sex) care

BCU MSU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

asigură transferul de material genetic de la donator la celula receptoare. Acestea se mai numesc *conjugoni*, factori de fertilitate sau *transferoni* şi în această categorie se includ:

a. Plasmidele F – (fertility factor) codifică sinteza unui canal de conjugare: *pilul F*. Funcție de raportul acestora cu cromosomul bacterian şi modul în care se face transferul materialului genetic, bacteriile se grupează în:
   - bacterii F^-, lipsite de factor F, "femele" receptoare de material genetic;
   - bacterii F^+, "mascule" donatoare de plasmide F, care sunt autonome în citoplasmă;
   - bacterii Hfr (High frecvency of recombination) care posedă o plasmidă F integrată în cromosom şi conferă o mare frecvență de conjugare şi recombinare. Plasmidele F integrate se transferă de obicei asociate cu alte gene cromosomale.
   - bacteriile F' – au o plasmidă numită factor de fertilitate recombinant, care are în structura sa şi unele gene din cromosomul în care a fost inițial integrată şi din care a trecut în stare autonomă; se comportă ca donatoare de material genetic.

b. Pasmidele R – au fost descrise de Watanabe (1960) şi sunt elemente extracromosomale care conferă celulei purtătoare rezistență la unul sau mai mulți agenți antimicrobieni. Plasmidele R au fost evidențiate la numeroase specii patogene care, datorită prezenței acestora au devenit rezistente la antibioticele şi chimoterapicele utilizate curent în terapia antiinfecțioasă. Prezente în număr de 1- 2 în celulă, unele plasmide R pot fi eliminate spontan, când presiunea selectivă a agenților antimicrobieni diminuează sau dispare, dar la unele bacterii (*Pseudomonas*) sunt foarte stabile, integrate în mecanismele biochimice ale celulei.

c. Plasmidele "col" – sunt elemente genetice extracromosomale care codifică producerea de colicine (exotoxine celulare, cu acțiune antibiotică) de către tulpini de *Enterobacteriaceae*. Fenomenul de colicinogeneză a fost descoperit de Gratia în 1925, la tulpini de *Escherichia coli*, dar mai târziu s-a constatat că acest mecanism este foarte răspândit la bacterii şi a fost numit *bacteriocinogeneză*, iar substanțele antibiotice produse – *bacteriocine*. Plasmidele "col" sunt transferabile de la tulpinile Col^+ la tulpinile Col^- prin transformare genetică, transducție fagică sau conjugare. Bacteriocinele elaborate de bacteriile Gram negative au un spectru de activitate limitat doar față de specia producătoare sau față de specii înrudite strâns, datorită interacțiunii specifice cu receptorii de pe membrana externă. La bacteriile Gram pozitive, lipsa de specificitate face ca bacteriocinele să posede un spectru larg de activitate. Prezența fenomenului de bacteriocinogeneză are probabil o semnificație biologică deosebită: reglarea dinamicii populației bacteriene în diverse ecosisteme; producerea de bacteriocine măreşte şansele de supraviețuire a celulelor care poartă plasmide Co! în dauna microorganismelor sensibile.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.Plasmide neconjugative, nu sunt infecţioase, prezenţa lor nu asigură starea de donator de material genetic.Transferul acestora (unele plasmide Col, R) se realizează prin intermediul unui fag.

După capacitatea de integrare în cromosomul bacterian, plasmidele pot fi: a). plasmide cu funcţii episomale, care există alternativ, în stare autonomă (libere în citoplasmă) sau integrate în genomul celulei gazdă; b). plasmide incapabile de integrare în cromosom şi persistă numai în stare autonomă.

Plasmidele asigură bacteriei funcţii şi proprietăţi noi, din care, mai importante sunt:

- Rezistenţa la agenţi antimicrobieni;
- Rezistenţa la metale grele (Hg^{2+}, Cd^{2+}, Bi, Pb, ioni de arseniat şi arsenit (*Staphylococcus aureus*);
- Rezistenţa la UV (*Escherichia coli*);
- Producerea de toxine sau factori de virulenţă şi patogenitate: enterotoxina, hemolizina, factorul de virulenţă la *Escherichia coli*;
- Producerea de bacteriocine;
- Capacitatea de a utiliza substanţe cum sunt camforul, octanul, unele hidrocarburi (*Pseudomonas*);
- Capacitatea de a utiliza anumite substraturi cum ar fi lactoza (*Proteus*);
- Capacitatea de transfer de material genetic prin conjugare şi formarea pililor de sex;
- Producerea de antibiotice (Cloramfenicol).

Semnificaţia biologică a plasmidelor

Prezenţa plasmidelor asigură unele avantaje metabolice, capacitate de adaptare şi de rezistenţă la condiţii adverse prezente în mediu.

Semnificaţia biologică a plasmidelor este cu atât mai importantă dacă se are în vedere posibilitatea transferului plasmidic între specii şi chiar genuri diferite. Plasmidele prezente la bacteriile patogene, conferă rezistenţă multiplă la antibiotice, amplifică virulenţa şi patogenitatea prin determinanţii genetici pe care îi poartă.

Variabilitatea genotipică la bacterii

Mutaţiile cromosomice

Mutaţiile pot apare la două niveluri:

- *celular*, în cadrul unei populaţii de indivizi care diferă de bacteria de origine (ex. o cultură de bacili ai tuberculozei, care nu au venit niciodată în contact cu streptomicina,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prin cultivare pe mediu care conține antibioticul, permite selectarea bacteriilor rezistente);

- *molecular*: modificarea întâmplătoare a secvenței nucleotidice dintr-o genă, duce la modificarea informației genetice.

Caracterele mutațiilor

1. Mutațiile apar rar: într-o populație de 10^6 – 10^9 bacterii, probabilitatea apariției unei mutații este de 1. Rata mutației este constantă în timp, factorii de mediu modificând doar numărul mutanților. Mediul are rol selectiv: vor supraviețui numai mutanții care au dobândit un caracter util pentru specie şi sunt mai bine adaptați la condițiile mediului.
2. Mutațiile sunt discontinue şi stabile. Modificarea între tipul sălbatic şi tipul mutant are loc într-o singură etapă, fără forme intermediare, după regula "totul sau nimic" şi odată apărută, se transmite la descendenți ereditar. Uneori, printr-o mutație inversă (retromutație) mutanții pot reveni la tipul sălbatic.
3. Mutațiile sunt specifice pentru un caracter dar şi *independente* în sensul că o bacterie poate fi supusă simultan la două mutații distincte.

Mecanismul molecular al mutațiilor

Gena este un segment de ADN care determină secvența bazelor în molecula de ARN m şi apoi prin translație, secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic.

Mutația este o modificare permanentă în structura genei (unitatea de transmitere a mesajului ereditar) chiar dacă fenotipic, modificarea nu este detectabilă.

Gena poate exista în forme mutaționale diferite numite *alele*. Fenomenul de mutație apare natural, dar frecvența mutațiilor creşte în prezența unor factori fizici sau chimici (agenți mutageni).

Modificarea secvenței bazelor nucleotidice se realizează prin:

- substituirea unei purine sau pirimidine cu o altă bază din acelaşi grup (tranziție) sau a unei purine cu o pirimidină (sau invers) (*transversie*).

Schimbările nucleotidice antrenează erori în codul genetic (*mutații cu sens eronat*) prin introducerea unui singur aminoacid diferit sau prin oprirea sintezei polipeptidice (*mutații non-sens*) ca urmare a introducerii unui codon care opreşte citirea;

- inserții sau deleții: în lanțul nucleotidic al unei gene se pot intercala baze suplimentare care decalează toată secvența mesajului care se găseşte după aceasta. Proteina care se sintetizează astfel nu are nici o legătură cu proteina fiziologică (Fig.4.3).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

AAA TAA CGA GAT TTA ATT

Lys ------- Trypt ------- Arg -------- Asp --------- Leu Isoleu

AAA GTA ACG AGA TTT ATT

Lys ------- Val ------- Thr -------- Arg --------- Phen -------- Ser

Fig.4.3 Modificări în structura proteinelor prin introducerea unei baze suplimentare.

De asemenea, pierderea unei nucleotide prin deleţie, decalează citirea. Mutaţiile punctuale pot determina revenirea la fenotipul original.

Mutaţii prin adiţia sau deleţia de material genetic

Prin macroinserţia unei secvenţe de ADN străin într-o genă, se intrerupe, prin noile baze interpuse, secvenţa normală şi aceasta determină pierderea funcţiei anterioare codificată de genă (Fig.4.4).

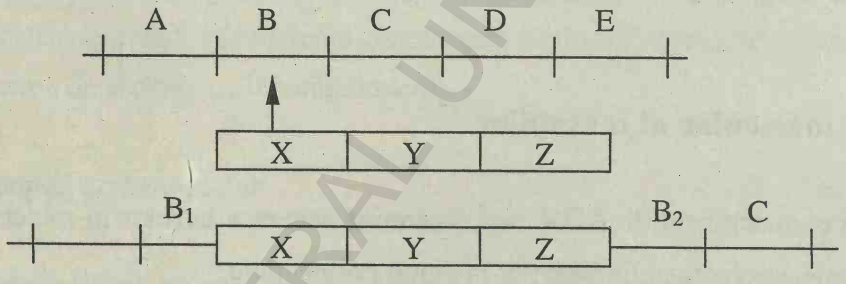


Fig.4.4 Inserţia unei secvenţe de ADN străin (transposon) în secvenţa normală de baze azotate ale genei

Prin deleţia materialului genetic se poate restaura tipul original. O deleţie importantă poate afecta două gene vecine.

În general mutaţiile nu afectează proprietăţile vitale ale bacteriilor şi privesc morfologia (cilii, finibriile, sporii, capsula, peretele celular, dimensiunile celulei), caracterele nutriţionale şi biochimice (apariţia sau dispariţia necesităţii unui factor de creştere; prototrofe – auxotrofe); fermentarea unui hidrat de carbon, degradarea unui aminoacid, structura antigenică, virulenţa, rezistenţa la antibiotice şi bacteriofagi, etc.

Mutaţiile de rezistenţă la antibiotice pot surveni prin: modificarea permeabilităţii membranei citoplasmatice, reducerea sau dispariţia afinităţii dintre situsurile active ale enzimelor şi antibiotic,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dobândirea unei activităţi enzimatice de degradare a antibioticelor (ex. beta – lactamazele, care hidrolizează beta – lactaminele, adenilaza şi fosforilaza pentru aminozide, etc.).

Cunoaşterea modificărilor în secvenţa nucleotidică a unei gene, care se transmit ereditar, au o serie de aplicaţii:

- asocierea de antibiotice în terapia unor infecţii pentru a evita selecţionarea de mutanţi rezistenţi;
- teste de mutageneză: în mediu sunt produşi chimici care se pot comporta ca agenţi mutageni (agenţi potenţiali cancerigeni); aceştia pot fi identificaţi ca medicamente, conservanţi şi coloranţi alimentari şi capacitatea lor mutagenă se selectează prin însuşirea de a modifica frecvenţa mutaţiei într-o cultură microbiană.

Transferul genetic

Patrimoniul genetic se poate modifica şi prin transferul de ADN de la o bacterie donator la alta receptor prin: *transformare, transducţie* şi *conjugare*. Transferul este în mod obişnuit urmat de un proces de recombinare legitimă între *exogenot* (genele bacteriei donator) şi *endogenot* (materialul genetic al bacteriei receptor). Informaţia transferată este stabilă şi se va transmite ereditar.

În absenţa recombinării legitime sunt şi alte mecanisme prin care se dobândesc gene: *conversie, transfer de plasmide* şi fenomenul de *transpoziţie*.

Transformarea constă în transferul unui fragment de ADN liber provenit de la o bacterie donator, fie prin liza acesteia, fie prin extracţie chimică. Fenomenul a fost descoperit de Griffith în 1928, în urma unor experimente privind virulenţa pneumococilor pentru şoarece, dar a fost explicat de MacLeod şi MacCarthy în 1944.

Pneumococii se prezintă sub formă capsulată, virulentă pentru şoarece şi care formează colonii de tip S (smouth) şi necapsulată, nevirulenţi, care dau colonii de tip R (rough). Înocularea la şoarece a pneumococilor tip S, capsulaţi, virulenţi determină o septicemie mortală. Inocularea şoarecilor cu pneumococi capsulaţi, omorâţi prin căldură sau cu pneumococi vii necapsulaţi, nu omoară şoarecii. Şoarecii însă mor dacă sunt inoculaţi cu acest amestec. Rezultatul experimentelor l-a făcut pe Griffith să afirme că pneumococul necapsulat, nevirulent s-a transformat în penumococ virulent, capsulat, pe baza polizaharidelor capsulare. În 1944 Avery şi colab. dovedeşte că transformarea pneumococilor este dată de ADN provenit de la formele virulente. Transformarea nu mai are loc dacă ADN obţinut din pneumococii virulenţi este tratat cu dezoxiribonuclează, înainte

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de a fi pus în contact cu pneumococii necapsulați, nevirulenți. Astfel, Avery, considerat întemeietorul geneticii moleculare, demonstrează că ADN este suportul material al eredității.

Transformarea are loc numai dacă celulele se găsesc într-o stare fiziologică specială – *starea de competență* tranzitorie şi de scurtă durată, care la rândul ei este determinată de prezența la suprafața celulei bacteriene a factorilor de competență.

La unele specii transformarea se poate obține prin amestecul culturilor donator şi receptor care indică posibilitatea existenței fenomenului şi în natură, nu numai în condiții de laborator.

Capacitatea transformantă a ADN depinde de mărimea fragmentului exogen (aproximativ 1% din cromosomul bacterian). Frecvent în cursul procesului de transformare se transmite un singur caracter (marker).

Etapele transformării

Trasformarea se realizează în mai multe etape:

- *Etapa de absorbție (fixare):* ADN se fixează, la nivelul receptorilor, inițial cu o extremitate (fixare reversibilă) şi apoi cu cealaltă extremitate (fixare ireversibilă);
- *Etapa de penetrație* – fragmentul pătrunde progresiv în celulă şi este rezistent la acțiunea dezoxiribonucleazei;
- *Etapa de eclipsă*: fragmentul este desfăcut în două catene din care una îşi menține integritatea şi cealaltă este fragmentată sub acțiunea nucleazei;
- *Etapa de integrare* se face prin ruperea unei catene a ADN endogen şi inserția fragmentului de ADN donator. Secvența omologă din catena pereche de ADN endogen se desprinde şi este înlocuită cu o copie a fragmentului exogen. Secvența integrată se replică sincron cu întreg cromosomul.

Transducția

Transferul unui fregment de ADN de la o bacterie la alta prin intermediul unui bacteriofag are loc prin transducție, care poate fi:

- *Transducție localizată* (restrânsă specifică) – fenomen asociat cu starea de bacterie lisogenă, obținută prin integrarea fizică a genomului fagic (profag) într-o regiune precisă (situs de ataşare) a cromosomului bacterian. În populația bacteriană, lisogenă, profagul se eliberează (excizare) din cromosom pentru a intra într-un proces de multiplicare vegetativă urmată de liza celulei. Excepțional profagul poate importa şi una din genele vecine cu punctul de integrare a genomului fagic şi astfel modificat, prin eliberarea din celulă, particula transductoare va infecta o

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nouă bacterie sensibilă în cromosomul căreia se va integra (Fig.4.5). Astfel, prin transducția unei gene gal^+ (concomitent cu genomul fagic), bacteria gal^-, devine gal^+ (proprietatea de a metaboliza galactoza) (Fig.4.6).

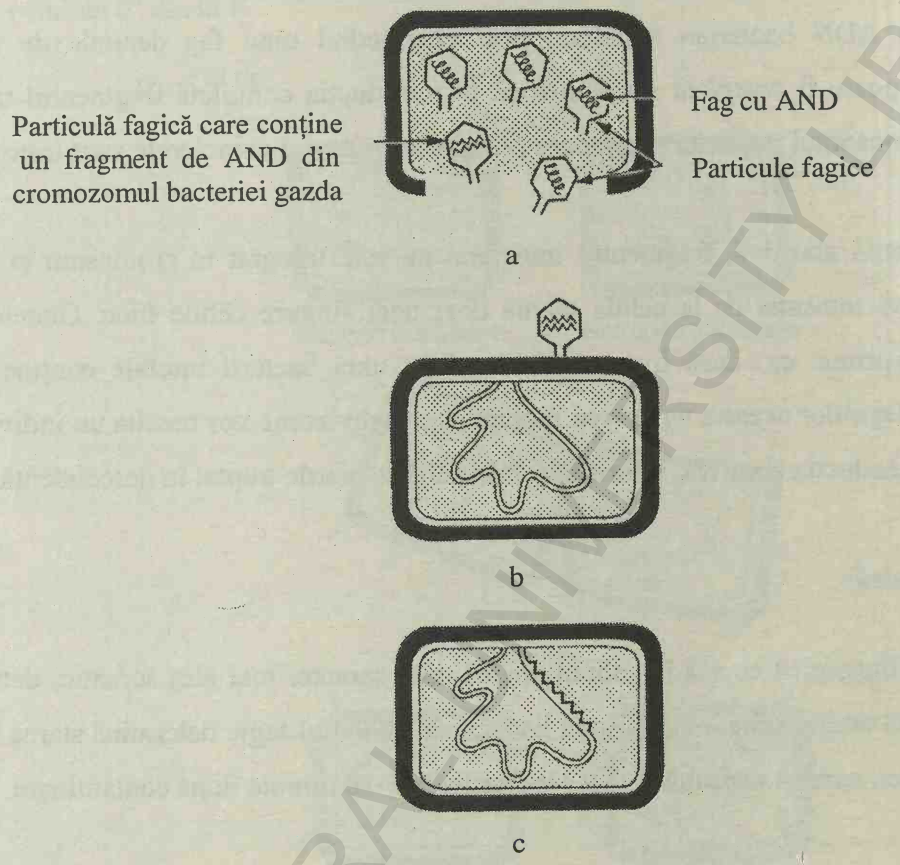
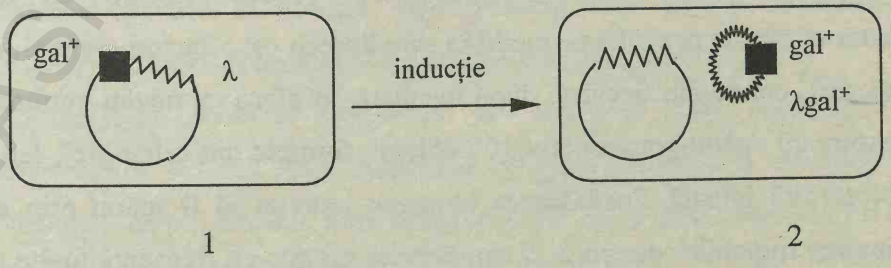


Fig.4.5 Transducția. Transferul de gene dintr-o bacterie în alta prin intermediul fagilor

a. Bacteria infectată cu fag lizează cu eliberare de noi particule fagice;

b. Fag care poartă un fragment de AND bacterian pătrunde într-o celulă receptoare;

c. AND bacterian din fag se integrează în cromosomul bacteriei receptoare



1 – profag inserat

2 – gena gal^+ este importată în momentul eliberării

Fig.4.6 Reprezentarea schematică a formării de particule transductoare

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transducția generalizată

Prin infecția unei bacterii sensibile, fagul care posedă o nuclează, fragmentează cromosomul bacterian şi opreşte total sinteza de macromolecule bacteriene. Un fragment oarecare din cromosom se poate integra în capsida fagului şi este transferat bacteriei receptoare.

Destinația ADN bacterian transferat prin intermediul unui fag depinde de modalitatea transducției care poate fi *completă* sau *abortivă*. În transducția completă fragmentul transferat se integrează în cromosomul bacteriei receptoare prin recombinare şi caracterele sunt transmise la toți descendenții.

În transducția abortivă, fragmentul transferat nu este integrat în cromosom şi deci nu se poate replica, fiind transmis de la celula mamă doar unei singure celule fiice. Genele conținute continuă să se exprime: ex. dacă fragmentul transferat unei bacterii imobile conține gene care codifică senteza flagelilor aceasta va deveni mobilă şi prin diviziune vor rezulta un individ mobil şi altul imobil. În transducția abortivă, informația dobândită se pierde treptat în descendență.

Conversia lisogenică

Conversia litogenică constă în achiziționarea unui caracter mai ales somatic, determinat de prezența genomului unui profag. În conversia lisogenică, genomul fagic determină starea lisogenă şi induce noul caracter, care se exprimă la toate bacteriile în 8-10 minute după contaminare.

Conjugarea

Acest mod de transfer al ADN este definit ca un proces sexual strict care necesită contactul celulelor parentale (Fig.4.7).

Fenomenul de conjugare la bacterii a fost descoperit de Lederberg şi Tatum în 1946, care au ales doi mutanți poliauxotrofi, (obținuți dintr-o tulpină prototrofă de *Escherichia coli* K12) care aveau următoarele caractere: mutantul A: tre^+, leu^+, ti^+, fen^-, bi^-, mutantul B: tre^-, leu^-, ti^-, fen^+, bi^+. Niciunul din aceştia nu se puteau dezvolta pe medii în care lipseau cei 5 factori esențiali de creştere. Cultivați în amestec, (10^8 celule din fiecare), după incubare, în placa cu mediu minimal, lipsit de aceşti factori de creştere au apărut aproximativ 100 colonii, formate din celule tre^+, leu^+, ti^+, fen^+, bi^+, ca şi tulpina prototrofă inițială. Posibilitatea ca aceşti indivizi să fi apărut prin mutație era exclusă, deoarece apariția mutațiilor pentru 2 -3 caractere se produc cu frecvență foarte mică (10^{-14} – 10^{-21}). În 1952 Hayes a constatat că tulpinile parentale se comportă diferit în timpul conjugării, fiind diferențiate sexual: una din celule este donator şi conține un determinant genetic de sex numit

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

factor de fertilitate (F) care permite sinteza pililor sexuali (F^+, celule mascule) şi transferul ADN în celula receptoare sau femelă (F^-).

Factorul F este o structură extracromosomală, circulară, care se multiplică autonom şi se transferă uşor în cursul conjugării. Prin conjugarea dintre F^+ şi F^-, în aproximativ 60 de minute peste jumătate din celulele F^+ devin F^-.

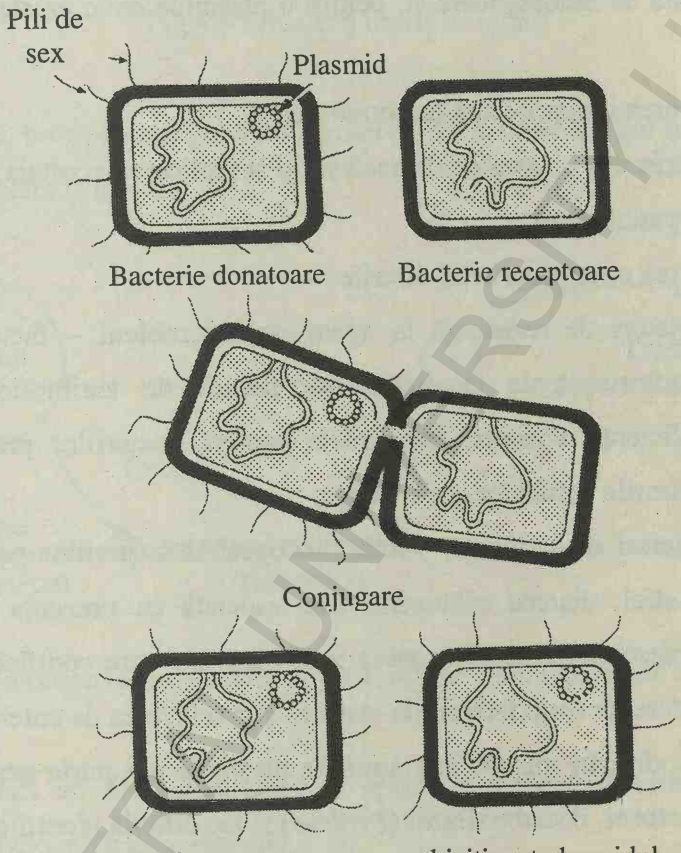


Fig.4.7 Transferul genelor prin conjugare

Transferul de gene cromosomale. Caracteristici:

- *Specificitatea.* Transferul de ADN cromosomal urmat de recombinare genetică este un caracter specific al speciei. Este prezent mai ales la bacteriile Gram–negative (*Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa*);
- *Diferențierea sexuală.* Transferul are un sens unic (orientat) care evidențiază diferențierea sexuală între donator şi receptor. Factorul F codifică propria replicare, biosinteza de pili sexuali, transferul şi posibila inserție în cromosomul bacterian.
- *Transferul de ADN cromosomal* este de aproximativ 10^{-4} dar, în populațiile F^+ au fost izolați mutanți cu înaltă frecvență de transfer cromosomic, notați Hfr (High frecvency of recombination).

BCU IAŞI / CENTRUL UNIVERSITAR / LIBRARY

Transferul de gene plasmidice. Caracteristici:

- Conjugarea este o cale obişnuită de transfer a plasmidelor la bacteriile Gram-negative. La *Staphylococcus aureus*, transferul plasmidic se realizează prin transducţie, deoarece plasmida nu este autotransferabilă;
- Capacitate de autoreplicare şi, pentru o plasmidă dată, existenţa în celulă a mai multor copii;
- Transferarea independentă (autotransfer);
- Pătrunderea altei plasmide de acelaşi tip şi replicarea acesteia (imunitate la suprainfecţie şi incompatibilitate);
- Codificarea unor proprietăţi diferite:
    - factori de rezistenţă la agenţi antimicrobieni – factori R. Apariţia tulpinilor multirezistente la numeroase familii de antibiotice limitează considerabil eficienţa acestora. Plasmidele conferă bacteriilor proprietatea de a rezista la sărurile metalelor grele toxice;
    - factori de virulenţă: puterea patogenă a bacteriilor poate fi mediată plasmidic. Astfel, diareea călătorilor este asociată cu prezenţa tulpinii *Escherichia coli* enterotoxigenă, posesoarea unei plasmide care codifică doi factori de virulenţă: aderenţa (prin factorii de ataşare) şi producerea de enterotoxină.
    - modificări metabolice: anumite plasmide pot purta gene care codifică hidroliza lactozei, decarboxilazei (*Proteus*) şi fac dificilă identificarea bacteriană.

Numeroase plasmide nu au nici o funcţie cunoscută şi se numesc *plasmide criptice.*

Conjugarea pentru bacteriologia medicală şi achiziţionarea de gene plasmidice, care modifică sensibilitatea la antibiotice a bacteriilor ilustrează remarcabila capacitatea de adaptare a acestora.

Transposonii

Transposonii sunt secvenţe de ADN dublu catenar care provin dintr-un cromosom sau plasmide şi prin recombinare se localizează în genomul cromosomal sau plasmidic.

Transposonii bacterieni au fost descoperiţi în 1971 prin studierea fenomenului de transpoziţie a unei gene care codifică o beta-lactamază, de pe o plasmidă pe alta. Aceştia au în structură 700 – 10.000 perechi de baze azotate şi transpoziţia are loc prin informaţia codificată de genele proprii. Extremităţile sunt delimitate de secvenţe identice (Fig.4.8).

EGUMSI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

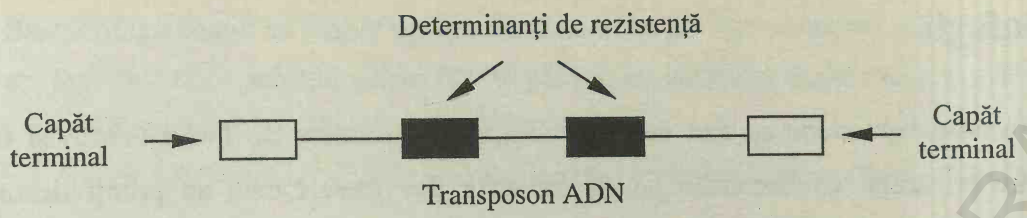


Fig.4.8 Structura transposonului

La locul de inserție, transposonii pot antrena deleții, inversiuni sau pot transporta o secvență a gazdei spre o nouă localizare (Fig.4.9).

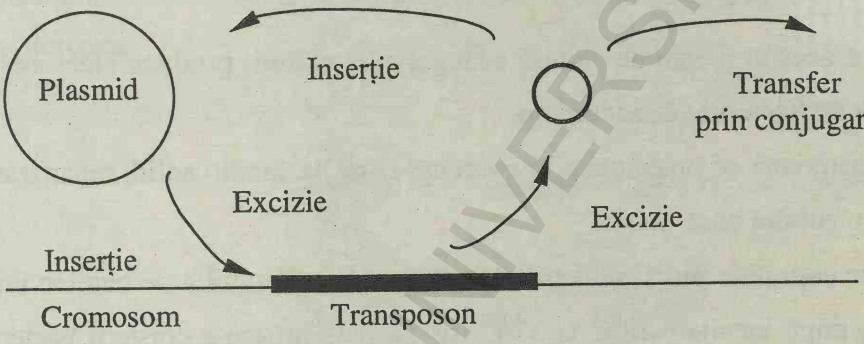


Fig.4.9 Reprezentarea schematică a posibilității fenomenului de transpoziție

Transposoni identici au fost identificați la specii bacteriene diferite: *Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae.*

Aceste elemente genetice mobile prezintă un intens deosebit pentru microbiologia medicală, deoarece pot purta gene de rezistență la antibiotice (Tabel 4.1) sau gene de virulență (enterotoxina la *Escherichia coli*).

Unii factori pot favoriza sau inhiba transpoziția: mercurul favorizează transpoziția transposonilor care poartă gena de rezistență la mercur.

Tabel 4.1 Transposoni şi rezistența la antibiotice pe care o codifică.

Nr. crt.	Transposon (Tn)	Rezistența la antibiotic
1.	Tn 1	Ampicilina
2.	Tn 4	Ampicilina, streptomicina, sulfamide
3.	Tn 5	Kanamicina
4.	Tn 7	Trimetoprim, nivel scăzut la streptomicină
5.	Tn 9	Cloramfenicol
6.	Tn 10	Tetraciclina

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacteriofagii

Virusurile bacteriene au fost descoperite aproape simultan de Twort (1915) şi D'Herelle (1917), care au arătat că bacteriile pot fi infectate de virusuri care au primit denumirea de *bacteriofagi*. Acţiunea lor infectantă se traduce in vitro prin liza celulei bacteriene.

Liza celulei bacteriene sub acţiunea bacteriofagilor

Dacă în cultura în mediu lichid a unei bacterii se adaugă un fag activ după câteva ore se constată o clarificare completă a mediului de cultură: manifestarea vizibilă a fenomenului de liză bacteriană .

Filtratul acestui mediu de cultură adăugat altei culturi, produce efect asemănător: liza este transmisibilă între bacteriile de acelaşi tip.

Liza bacteriană se poate pune în evidenţă şi pe un mediu solid, repartizat în placă Petri şi însămânţat cu o cultură bacteriană.

Dacă pe suprafaţa plăcii se depune o picătură din filtratul care conţine un fag activ asupra acestei culturi, după incubare 18^0C la 37^0C, se constată prezenţa creşterii bacteriene, cu excepţia zonei în care este prezent lichidul fagic, unde bacteriile au fost lizate (Fig.4.10).

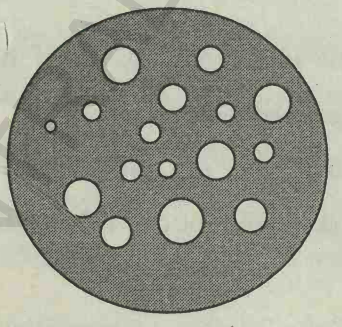


Fig.4.10 Zone de liză formate într-o placă inoculată cu o tulpină lizogenă

Morfologia şi structura bacteriofagului

Există în prezent aproximativ 2800 de fagi izolaţi şi analizaţi la microscopul electronic. Este posibil ca acelaşi tip de bacterie să fie gazdă pentru numeroşi fagi.

Dintre bacteriofagii cu ADN cei mai bine studiaţi sunt cei din seria T, notaţi de la T1 La T7, specifici pentru *Escherichia coli.*

Bacteriofagii prezintă structura şi proprietăţile generale ale virusurilor. Morfologia lor este variată: filamentoşi, poliedrici, sau formaţi din cap icozaedric şi o coadă helicală.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacteriofagii conţin un singur tip de acid nucleic închis într-o capsidă proteică:

a. *fagi cu ADN* – acidul nucleic este bicatenar, cu greutatea moleculară mare, care permite codificarea a peste 200 proteine diferite (T2);
b. *fagi cu ARN* – acidul nucleic este monocatenar cu greutatea moleculară mică (echivalent a 3 gene).

Fagul T2 are un cap poliedric, reprezentat de o capsidă proteică care înconjoară o moleculă de ADN cu capetele libere şi o coadă de 100 nm lungime, formată dintr-un cilindru gol, care comunică cu capul şi o teacă proteică contractilă. Extremitatea distală a cozii se termină cu o placă hexagonală, *placa bazală*, pe care se inseră spicule şi filamentele caudale prin care bacteriofagul se fixează de bacteria sensibilă (Fig.4.11).

Infecţia constă în pătrunderea în celula gazală doar a ADN fagic, fără capsidă proteică, care are rol de înveliş protector.

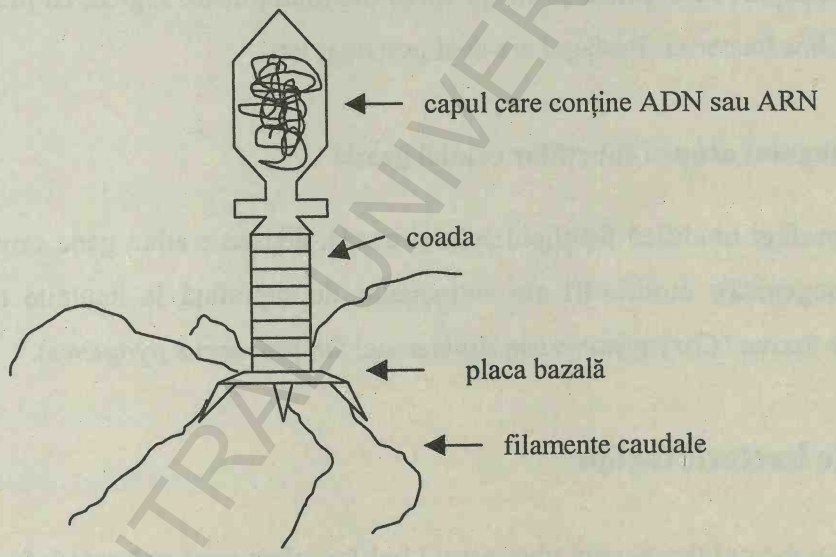


Fig.4.11 Bacteriofagul T2

Expresia genomului fagic

După pătrunderea ADN fagic începe ciclul de multiplicare; în primele 12 – 15 minute, nu se găsesc particule fagice în bacteria infectată. Este faza de eclipsă care corespunde fazei vegetative a fagului. Funcţiile celulei sunt dezorganizate şi intră în funcţie mecanismele care asigură sinteza elementelor fagice. Fagii maturi sunt puşi în libertate, după aproximativ 25 minute de la infectare, prin ruperea peretelui celular, în urma acţiunii unei enzime, *endolizina*, codificată de fag.

Infecţia non-litică (lizogenia). Fagii temperaţi.

Când fagii temperaţi infectează o bacterie, pot iniţia un ciclu complet de multiplicare, cu liza celulei sau îşi integrează ADN în cromosomul bacterian, situaţie în care bacteria rămâne viabilă, se

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

multiplică şi implică genomul fagic concomitent cu genomul propriu (bacterie lisogenă).

Bacteria lisogenă posedă şi transmite descendenţilor capacitatea de a produce fagi în absenţa infecţiei. În 1950, Lwoff, a arătat că *Escherichia coli* lisogenă prin fagul lambda, se poate divide fără a produce fagi liberi. Dar în cadrul acestei populaţii anumiţi indivizi produc fagi care lizează bacteria. Bacteriile lisogene sunt imune la fagul pe care-l poartă: dacă ADN este injectat în celulă, acesta nu se poate replica şi nici nu determină liza. Lisogenia se bazează pe o asociere strânsă între ADN fagic şi ADN bacterian materialul fagic integrat în cromosomul bacterian se numeşte *profag*.

Profagul este integrat într-un loc precis în ADN bacterian şi nu îşi exprimă funcţiile în celulă, ci sintetizează doar continuu, un represor specific, citoplasmatic, care reprimă expresia totală a funcţiilor genomului fagic.

Razele X, UV, unele substanţe chimice (mitomicina), inactivează expresia genei represor.

Genele fagice se exprimă şi începe ciclul de multiplicare fagică, cu producerea de particule infecţioase şi liza bacteriei. Profagul are deci potenţial letal.

Efectele profagului asupra funcţiilor celulei gazdă

Unii profagi modifică fenotipul celulei gazdă, deoarece aduc gene care codifică funcţii noi (conversie lisogenică): modificări ale antigenelor de suprafaţă la anumite tulpini (*Salmonella*), producerea de toxine (*Corynebacterium diphteriae, Streptococcus pyogenes*).

Aplicaţii ale bacteriofagilor

1. *În domeniul terapeutic:* tratamentul bolilor infecţioase cu bacteriofagi nu a dat rezultate eficiente deoarece fagii trebuie să ajungă la locul infecţiei, în contact cu bacteria sensibilă, mutanţii rezistenţi se selectează rapid şi apar imediat anticorpi neutralizanţi care intervin în adsorbţia fagilor.
2. *Lisotiparea.* Laboratoarele specializate posedă colecţii de fagi cu care se face lisotiparea speciilor care se subdivid în numeroase lisotipuri, funcţie de prezenţa sau absenţa receptorilor specifici, furnizând date importante pentru epidemiologie.
   Fagii sunt indicatori pentru unele specii bacteriene prezente într-un anumit mediu.
   Identificarea bacteriofagilor specifici pentru *Salmonella* în apele de râu sau de conductă, indică prezenţa bacteriei în acest biotop.

3. Recent, faptul că numeroşi agenţi chimici care induc exprimarea funcţiilor profagului, au potenţial cancerigen a dus la utilizarea bacteriilor lisogene în testele de screening pentru detectarea compuşilor cu acţiune cancerigenă.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. *Medical Microbiology*, The C.V. Mosby Company, Baltimore, 30-36, 1990.

Sleigh JD, Timbury MC. *Notes on medical bacteriology*, second edn, Churchill Livingstone, New York, 22-32, 1986.

Wilson G, Miles A, Parker MT. *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virusology and immunology*, ed 7, Baltimore, Williams and Wilkins, 1984.

Zarnea G. *Tratat de Microbiologie Generală*. Ed Academiei Române, V3, 56-373,1986.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5

Metode rapide pentru detectarea bacteriilor

Metodele pentru determinarea contaminării bacteriene sunt în general dezavantajoase deoarece impun o perioadă de incubație de 15 – 72 ore până la obținerea rezultatului.

În cazul controlului de calitate al produselor farmaceutice se aplică metode care oferă rezultatul într-un timp scurt. Acestea sunt:

Microscopia

Bacteriile colorate cu orange acridină şi examinate la microscopul fluorescent, formele vii, spre deosebire de cele moarte, au o culoare portocalie. Această constatare a fost aplicată pentru determinarea numărului de bacterii, rezultatul fiind obținut într-o oră.

Metoda denumită *tehnica filtrării epifluorescente directe*, constă în filtrarea lichidului de testat peste o membrană filtrantă, colorarea filtrului cu orange acridină şi examinarea filtrului la microscopul fluorescent. Tehnica este cantitativă deoarece microorganismele pot fi numărate. Metoda este utilizată pentru determinarea contaminanților din fluidele administrate intravenos şi poate detecta până la 25 de bacterii/ml. Dacă lichidele sunt vâscoase este necesară diluarea lor. Compuşii solubili în apă se dizolvă înaintea filtrării.

Evaluarea pe baza rezistenței electrice

Celule bacteriene sunt slab conducătoare pentru curentul electric, comparativ cu soluția unui electrolit. Astfel, dacă bacteriile sunt interpuse în calea curentului electric, acestea opun rezistență. Dacă diametrul celulei bacteriene este apropiat de cel al secțiunii firului prin care trece curentul, căderea de voltaj cauzată de rezistența celulei este semnificativă şi poate fi măsurată cu instrumente corespunzătoare. Acest principiu studiat de Coulter Electronics, poate sta la baza evaluării unei populații bacteriene.

Flow citometria

Această tehnică, ca şi tehnica de numărare Coulter se bazează pe diferența de potențial dintr-un circuit care include un tub cu un mic orificiu scufundat în lichidul conductor (Fig.5.1).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă lichidul care conține particule materiale, celule sanguine, bacterii sau suspensii de materii anorganice este trecut prin tub, când trece prin orificiu, se produce o modificare a rezistenței circuitului care se detectează prin metode uzuale. Se determină atât numărul de particule în unitatea de timp cât şi dimensiunea lor.

Metoda are şi unele dezavantaje: se evaluează atât celulele vii, cât şi cele moarte; orificiul se poate bloca pe parcursul utilizării; dacă bacteriile sunt într-o suspensie care conține particule anorganice (cum ar fi suspensia de magneziu) sunt detectate atât bacteriile cât şi particulele de hidroxid de magneziu şi trebuie găsite tehnici care să deosebească cele două tipuri.

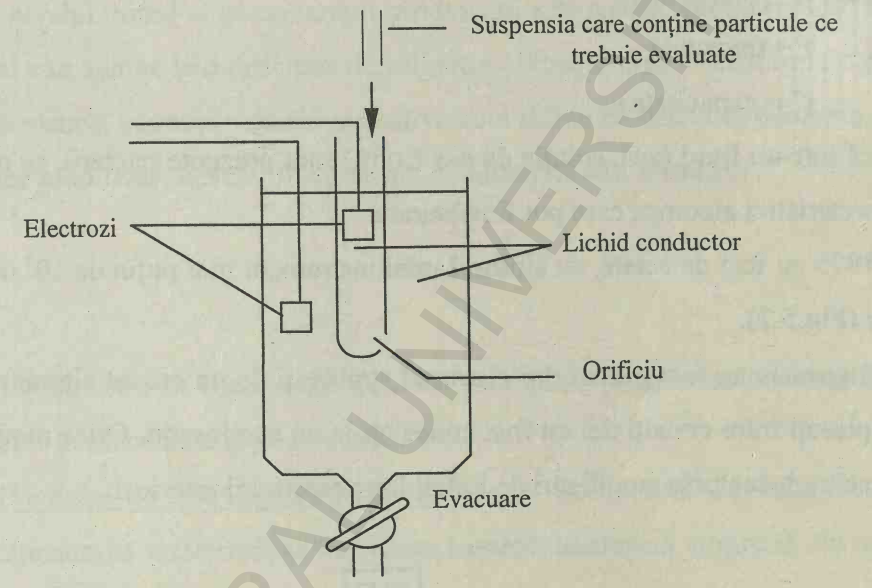


Fig.5.1 Principiul dispozitivului Coulter de numărare electronică a particulelor

Microcalorimetria

Metoda se bazează pe evaluarea cantității de căldură eliberată de bacterii în procesele metabolice. Căldura produsă în cantități mici este măsurată prin tehnici speciale microcalorimetrice. Proba care trebuie analizată se încorporează în mediul de cultură şi dacă sunt prezente microorganisme, din activitatea metabolică rezultă căldura care se măsoară. Prin această metodă microorganismele pot fi identificate, pe baza faptului că diferite microorganisme produc căldură în cantități specifice. Metoda microcalorimetrică permite identificarea microorganismelor în 3 ore.

Conductibilitatea electrică

Pentru ca un curent electric să străbată un conductor, trebuie aplicat un voltaj, care poate fi considerat similar presiunii necesare ca un lichid să treacă printr-o conductă. Forța care se opune

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

curentului electric se numeşte rezistenţă şi relaţia dintre rezistenţă, curent şi voltaj se exprimă prin legea lui Ohm:

$$\text{Rezistența} = \text{voltaj} / \text{curent}$$

In cazul curentului alternativ, pentru a trece prin conductor, sunt necesare forţe adiţionale, a căror sumă se numeşte impedanţă (Z) şi se exprimă matematic:

$$Z = R^2 + (1/2\pi fC)^2$$

Unde: R = rezistența,

f = frecvența

C = capacitatea.

Dacă într-un fluid (apă, soluţie de electroliţi) sunt prezente bacterii, se produc modificări ale acestor caracteristici electrice care pot fi măsurate.

In 1975 au fost detectate, cu ajutorul unui instrument mai puţin de 10^3 cel/ml prin măsurarea impedanţei (Fig.5.2).

In suspensie au fost plasaţi doi electrozi străbătuţi de un curent alternativ. Alţi doi electrozi aditionali, plasaţi între ceilalţi doi au fost conectaţi la un osciloscop. Orice modificare a impedanţei suspensiei se traducea prin modificări de voltaj între electrozii interiori.

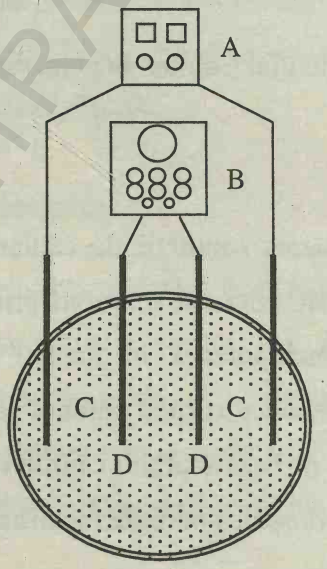


Fig.5.2 Măsurarea impedanţei. A – sursa de curent alternativ; B – osciloscop; C şi D – electrozi.

O tehnică apropiată este detectarea electrochimică, prin care se pot detecta minimum 10^8 celule/ml pentru bacterii şi 10^7 celule/ml pentru ciuperci.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fiecare din cei doi electrozi este confecționat dintr-un catod de oxid de argint (Ag_2O_2) și un anod de platină. Unul din anozi este separat de mediul de cultivare printr-o membrană de celuloză; celălalt anod este în contact direct cu mediul. In prezența unor celule vii, curentul care circulă între fiecare catod și anod poate fi măsurat, dar este mai mic, în cazul anodului izolat. Diferența între cele două valori ale curentului este proporțională cu numărul de celule viabile din mediu.

Produșii metabolici ai bacteriilor cultivate în medii lichide, produc modificări în conductibilitatea mediului. S-a constatat că modificări măsurabile de conductibilitate apar chiar dacă sunt 10 microorganisme/ml. Modificările mediului pot fi măsurate prin modificările impedanței (rezistența la curentul alternativ) sau prin schimbarea capacității electrice. Tehnica are anumite limite: dacă nivelul inițial al contaminării produsului este scăzut, proba trebuie incubată în bulion nutritiv, pentru a se ajunge la o densitate de cel puțin 10 bacterii/ml. Acest aspect prelungește durata testului. De asemenea, bacteriile nonfermentative sunt dificil de detectat, deoarece activitatea lor metabolică produce modificări nesemnificative ale conductibilității mediului.

Bioluminiscența

Câteva specii bacteriene au capacitatea de a emite lumină, proprietate utilizată în controlul de calitate al produselor farmaceutice și în cercetare.

Utilizarea sistemului de emitere a fluxului luminos. Producerea de lumină depinde de oxidarea unei substanțe numită luciferină, sub acțiunea enzimei luciferază, obținută din licurici.

Luciferina este redusă de luciferază, în prezența ATP și a magneziului, cu formarea unui complex luciferin-adenozin-monofosfat (AMP). In prezența oxigenului acest complex disociază, cu eliberare de lumină care se măsoară cu instrumente cum ar fi Luminiscence Biometer, ATP-Photometer sau kit-uri pentru detectarea ATP care includ și echipamentul de evaluare a luminii (luminometre). În reacție se consumă ATP; astfel, ATP se măsoară prin producerea de lumină.

Detectarea bacteriilor prin această metodă se bazează pe faptul că acestea, ca orice materie vie conțin ATP. Când se determină conținutul unor produse ca hrană, material clinic, apă, sunt necesare tehnici suplimentare pentru îndepărtarea ATP non-bacterian.

Utilizarea bacteriilor luminoase. Încă din 1942 a fost utilizată o bacterie natural producătoare de lumină – *Photobacterium fischeri* – pentru dozarea antibioticelor.

Prin inginerie genetică a fost posibil să se insere gene care controlează producerea de lumină în bacterii cu importanță medicală: *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Listeria spp., Mycobacterium smegmatis.* Extincția luminii produse de aceste bacterii indică eficiența activității biocide.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Bibliografie

Goldschmidt M.C., Wheeler T.G: *Determination of bacterial cell concentrations in urine specimens by electrical measurements*, In Microbiology 1975, ed. By D. Schlessinger, American Society for Microbiology, Washington, 6-11, 1975.

Calvin H.J., Sherris J.C: *Electrical impedance measurements in the reading and monitoring of broth dilution susceptibility tests*. Antimicrob Agents Chemother, 12:61-66, 1977.

Hobson P.N., Mann S.O: *Aplications of the Coulter counter in microbiology*, In: Automation, Mechanization and Data Handling in Microbiology, ed. By A Baillie and R.J. Gilbert. Academic Press, New York, 91-105, 1970.

Carberg D.M: *Principles of Optical and Electrical Methods for the Determination of Bacterial Populations*, In Antibiotics in Laboratory Medicine, ed. by Lorian V, Williams and Wilkins, Baltimore, 55-72, 1981.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6

Virusologie. Noțiuni generale

Noțiunea de virus

Virusurile sunt agenți infecțioși, care posedă un singur tip de acid nucleic: ADN (dezoxiribovirusuri) sau ARN ribovirusuri) fără posibilitatea sintezei proteice, a producerii și stocării de energie.

Lwoff, în 1953 și 1981, pentru a defini conceptul de virus, a stabilit caracterele specifice care le reunește într-o categorie unică.

- Sunt agenți infecțioși de tip special, iar infecția virală este dată de introducerea în celulă a materialului genetic viral, ceea ce le deosebește de bacteriile patogene;
- Parazitismul virusurilor este total diferit de parazitismul obligat-intracelular caracteristic unor bacterii (ex. rickettsiile își păstrează existența structurală și funcțională, fac biosinteze pe baza echipamentului enzimatic propriu și se divid pornind de la ansamblul constituenților lor celulari;
- Parazitismul virusurilor este condiționat de utilizarea sistemelor enzimatice ale celulei parazitate, de utilizarea ribosomilor și a ARNt sintetizat de celula gazdă.

Virusurile sunt parazite absolute, care s-au adaptat la gazde celulare diverse: procariote, plante, animale.

În celulele infectate cu virusuri, metabolismul este deviat în sensul producerii de virus nou, ca rezultat al procesului de replicare virală, pornind de la informația străină, adusă de genomul viral în celula gazdă.

Dimensiunile și forma virusurilor

Dimensiunea virusurilor se măsoară în nanometri (nm) și pot fi observate numai la microscopul electronic. Virusurile cu importanță clinică au dimensiuni cuprinse între 20-30 nm (picornavirusuri) și 300 nm (poxvirusuri).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Forma virusurilor poate fi de bastonaş (virusul mozaicului tutunului, fagii filamentoşi), sferică (virusul gripal), de obuz (rhabdovirus), paralelipipedică (poxvirusurile), de cireaşă cu coadă (fagii cu coadă icosaedrică), adenovirus (Fig.6.1).

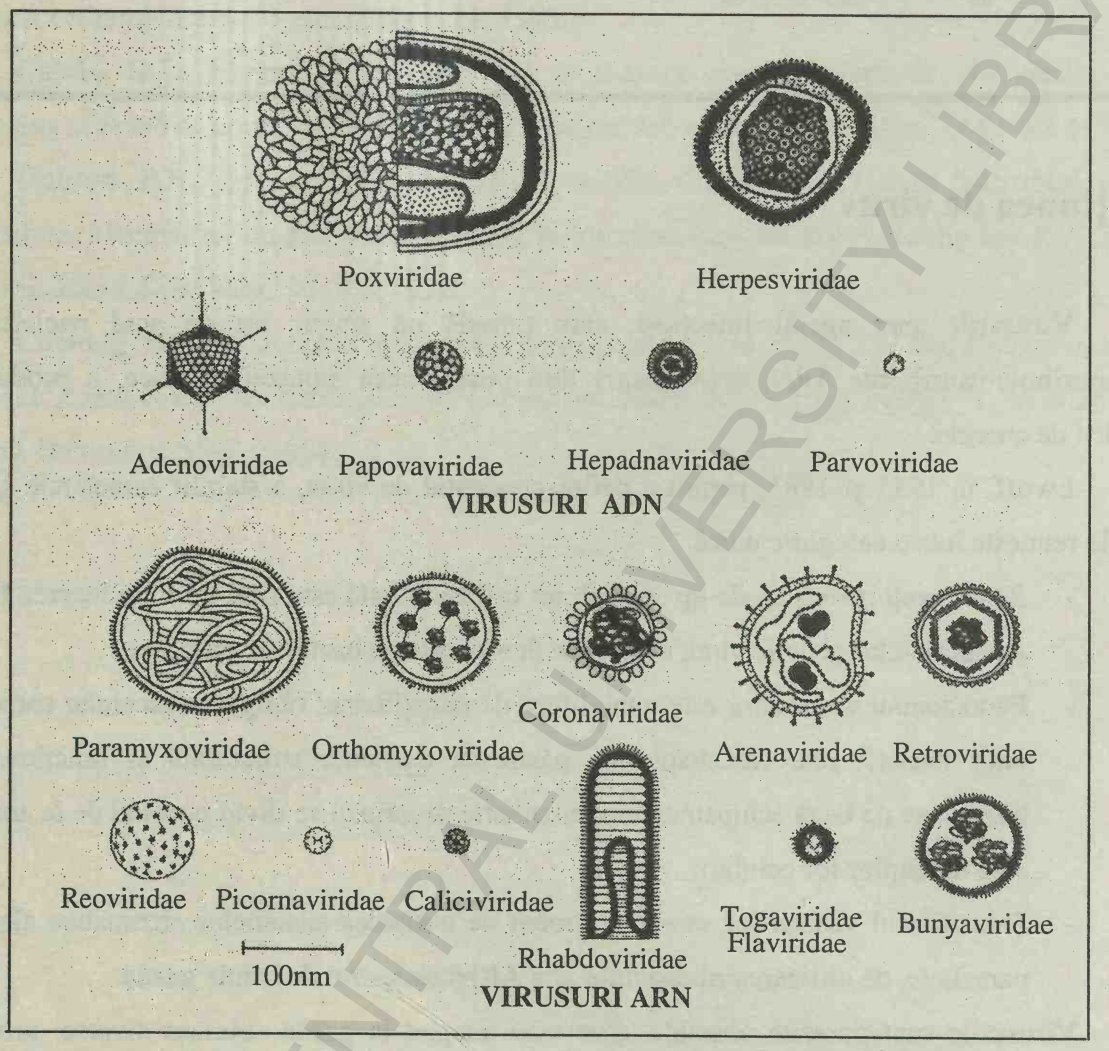


Fig.6.1 Forma şi dimensiunile principalelor virusuri animale (după Volk, 1992)

Structura virusurilor

Virusurile sunt alcătuite din doi constituenţi esenţiali: *genomul viral* şi *capsida* (care formează împreună nucleocapsida) precum şi un constituent accesoriu, *învelişul extern*, *peplos* (gr. peplos = manta) care provine din membrana citoplasmatică a celulei gazdă în care se inseră (Fig.6.2 şi 6.3).

Numeroase virusuri conţin enzime care intervin în replicarea virală.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

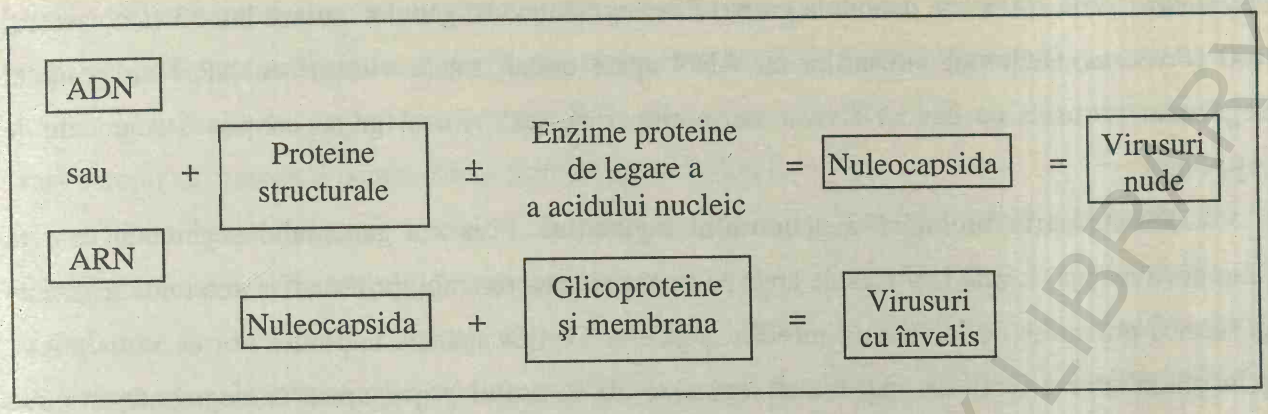


Fig.6.2 Structura schematică a virusurilor

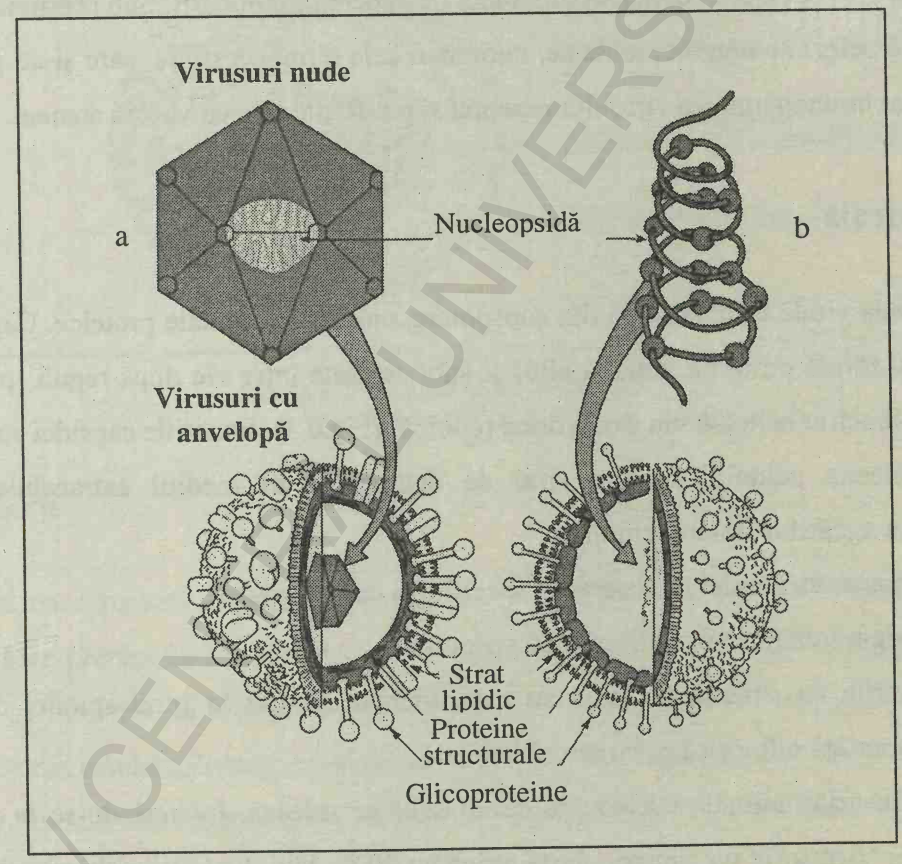


Fig.6.3 Structura a două virusuri diferite: fără înveliş şi cu înveliş, cu simetrie icosaedrică (a) sau helicală (b)

Genomul viral

Informaţia genetică este depozitată în molecule de ADN sau ARN monocatenar (mc) sau dublu catenar (dc) liniar sau circular, cu dimensiunea de 1,2 – 1,8 x 10^6 daltoni, la grupul

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Parvovirus şi de 200 x 10^6 daltoni la grupul *Poxvirus*. Numărul genelor variază între 3 (*Polyoma*) şi 160 (*Poxvirus*).Genomul virusurilor cu ADN apare unitar; unele virusuri cu ARN au genomul segmentat (virusuri cu genom divizat sau multipartit), (ex. virusul gripal conţine 8 segmente de ARN mc).

Semnificaţia biologică a genomului segmentat. Prezenţa genomului segmentat conferă anumite avantaje, legate mai ales de apariţia unor noi caracteristici, prin reasortarea unor segmente genomice provenite de la virusuri înrudite. Aşa s-ar explica apariţia tulpinilor noi de virus gripal, prin schimbarea a unul sau mai multe segmente ale virusului gripal uman cu segmente de virus aviar, porcin sau ecvin.

În urma replicării acizilor nucleici virali pot apare mutaţii, care cel mai frecvent duc la apariţia unui virus defectiv, deficient din punct de vedere al replicării. Sub presiunea unui factor din mediu, pot fi selectate anumite mutante, cum ar fi cele termosensibile, care şi-au pierdut virulenţa, dar au păstrat imunogenitatea virusului parental şi pot fi utilizate ca vaccin atenuat.

Capsida virală

Capsida virală este alcătuită din capsomere, unităţi funcţionale proteice. Capsomerele diferă ca mărime şi formă de la un virus la altul şi sunt asociate între ele după reguli precise, realizând structuri cu simetrie helicală sau icosaedrică (cubică) (Fig.6.3). Funcţiile capsidei sunt:

- protecţia acidului nucleic viral de degradarea în mediul extracelular sub acţiunea nucleazelor, a agenţilor fizici şi chimici;
- fixarea virionului de receptorii specifici ai celulei gazdă;
- asigurarea formei caracteristice virionului.

Virusurile cu simetrie helicală au capsomerele dispuse în jurul spiralei de acid nucleic, formând o suprafaţă cilindrică cu structură helicală .

La virusurile animale nucleocapsida alungită se rulează, închizându-se în peplos, încât ia forma sferică. Virusurile cu simetrie icosaedrică au 20 de feţe, toate triunghiuri echilaterale, 30 de muchii şi 12 vârfuri a căror aranjare dă aspectul aparent de sferă.

Virusurile icosaedrice mari sunt formate din 2 tipuri de capsomere: capsomere pentamerice (pentoni) situate la cele 12 vârfuri ale icosaedrului şi capsomere hexamerice (hexoni) care ocupă feţele şi crestele icosaedrului.

Numărul de capsomere diferă şi este un criteriu de clasificare a virusurilor (ex. caspida parvovirusurilor conţine 32 caspomere; capsida herpesvirusurilor – 162; a adenovirusurilor – 252).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sunt virusuri care au simetrie binară – bacteriofagii, la care capul, în care este inclusă nucleocapsida, are simetrie icosaedrică, iar coada, contractilă, structură helicoidală.

Virusurile cu organizare complexă. În acest grup intră virusurile animale, cele mai mari şi mai complexe, patogene pentru om şi animale (poxvirusuri).

Sunt formate dintr-un nucleiod care conţine ADN, înconjurat de o membrană omogenă, cu câte două mase ovoide laterale, "corpi laterali". Nucleoidul şi corpii laterali sunt acoperiţi de o altă membrană de suprafaţă, lipoproteică, care conţine fosfolipide, colesterol şi grăsimi neutre. Anvelopa apare la microscopul electronic ca fiind formată din tuburi aranjate la întâmplare (Fig.6.4)

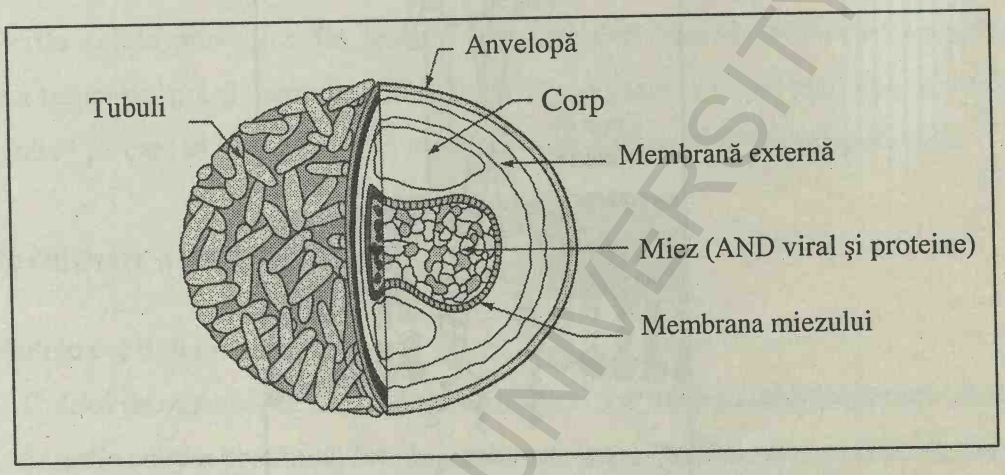


Fig.6.4 Structura unui poxvirus

Învelişul extern

Peplosul are structură similară membranelor celulare şi este format din lipide, proteine şi glicoproteine. Este prezent la o serie de virusuri cu ADN sau ARN, cu nucleocapsidă icosaedrică sau helicală şi se formează în ultimul stadiu al replicării, când virionii "inmuguresc" prin anumite zone ale membranei celulare, în timp ce părăsesc celula-gazdă.

Învelişul extern este alcătuit dintr-un strat central care poate avea proeminenţe – *spiculi*, de natură glicoproteică (Fig.6.5).

Multe glicoproteine acţionează ca proteine *virale de ataşare* (viral attachment proteins – VAPs) capabile de a se fixa pe structurile celulelor ţintă cum ar fi eritrocite (hemaglutinine). Alte glicoproteine, degradează mucoproteinele protectoare ale căilor respiratorii favorizând fixarea virusurilor pe celulele sensibile.

Stratul central are structura tipic trilamelară, format dintr-o foiţă bimoleculară de lipide, care separă spiculele de ceilalţi constituienţi ai virionului. Lipidele care îl formează provin din celula gazdă.

RCU "ŞTEFAN CEL MARE" UNIVERSITY LIBRARY

Ca orice membrană lipidică, învelişul extern (anvelopa) poate fi distrus de detergenţi şi solvenţi (ex. eter), care inactivează virusul.

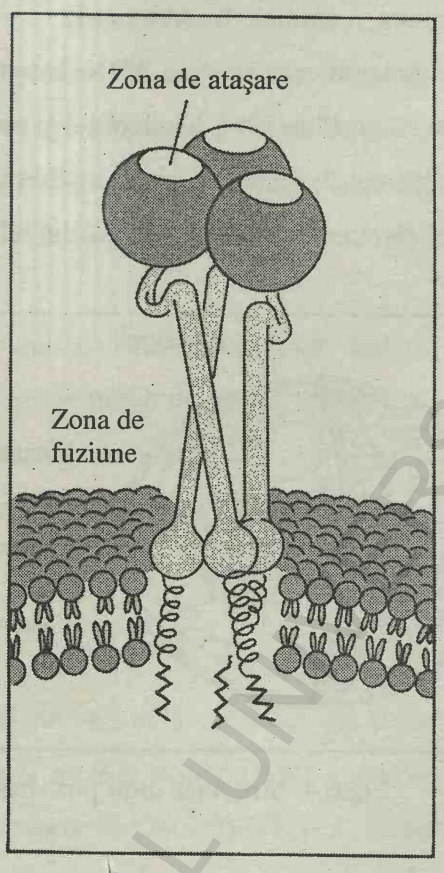


Fig.6.5 Structura spiculilor de pe suprafaţa particulei virale

Efectul agenţilor fizici şi chimici asupra virusurilor

Căldura este cea mai eficientă metodă de distrugere a virusurilor; majoritatea virusurilor umane sunt inactivate prin expunere la 60^0C, 30 minute. Virusul hepatitei poate supravieţui 4 ore la această temperatură.

La temperaturi scăzute, virusurile sunt stabile şi sunt păstrate la –40 până la -70^0C. Uscăciunea este nefavorabilă, dar sunt virusuri care rezistă la acest factor. Razele ultraviolete inactivează virusurile prin distrugerea acidului nucleic şi sunt utilizate pentru prepararea vaccinurilor gripale.

Virusurile care conţin lipide sunt inactivate de solvenţi (cloroform, eter); virusurile care nu conţin lipide rezistă la aceşti agenţi. Fenolii, alcoolii, sărurile de amoniu quaternar au activitate virucidă redusă; agenţii cei mai activi sunt clorul, hipocloriţii, iodul, aldehidele, oxidul de etilen.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cultivarea virusurilor

Parazite absolute obligat intracelular, virusurile cultivă numai în celule vii, din cauza lipsei echipamentului enzimatic propriu. Pentru cultivarea virusurilor se folosesc: culturi de celule, embrioni de găină şi în măsură limitată astăzi, animale de laborator sensibile.

Culturile de celule

Diferite celule provenite din ţesuturi intacte umane sau animale embrionare sau adulte, normale sau tumorale, pot fi menţinute în stare de supravieţuire sau pot prolifera in vitro, dacă au o suprafaţă solidă pe care să se fixeze şi un mediu favorabil (nutrienţi, pH, temperatură).

Metode de cultivare a celulelor

Celulele pot fi obţinute in vitro prin:

a. Culturi de organe – de fapt culturi de ţesuturi, obţinute ca mici fragmente de organe (intestin subţire proximal, bronhii, trahee, trompe uterine) menţinute în mediu de cultură adecvat pentru păstrarea structurii şi funcţiilor, utilizate pentru studiul unor virusuri respiratorii (coronavirusuri) sau enterice (rotavirus).
b. Culturi de celule propriu zise, sunt culturi iniţiate după disocierea unui ţesut în mici grămezi de celule, prin fragmentare mecanică, urmat de tratare cu enzime proteolitice.

Tipuri de culturi de celule

Diversele tipuri de celule au comportare diferită în culturi, putând fi menţinute limitat (câteva generaţii succesive) sau nelimitat. Se pot obţine culturi primare de celule, tulpini de celule diploide şi linii permanente de celule.

Culturi primare de celule. Din ţesutul sau organul spălat, secţionat şi dispersat enzimatic (cu tripsină) şi mecanic (cu agitator electromagnetic) se obţine o suspensie celulară cu densitatea de 150 000 – 200 000 celule/ml, în mediu de creştere tamponat, cu adaos de ser sanguin de viţel (pentru factori de creştere), care se repartizează în tuburi sau plăci sterile. Celulele aderă de sticlă, încep să se dividă şi formează un film continuu, un *strat monocelular*, moment în care cultura de celule poate fi infectată cu virus. Efectul citopatogen produs de virus se evidenţiază direct,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

examinând transparența tubului sau a plăcii. Subcultivarea se poate face de 5 – 6 ori, după care celulele în cultura primară mor.

Culturile secundare de celule se obțin din țesut embrionar şi pot fi subcultivate 40 – 50 generatii după care mor. După formarea filmului celular, multiplicarea celulelor diploide, ca şi a culturilor primare, încetează datorită inhibiției de contact.

Linii permanente de celule provin din țesuturi maligne (tumori canceroase) sau din mutante apărute spontan sau sub acțiunea unor agenți cancerigeni, în cultura de celule diploide.

Prezintă modificări morfologice şi inoculate la animal, produc tumori. Liniile permanente de celule şi-au pierdut inhibiția de contact şi pot fi subcultivate un număr nelimitat de generații. Un exemplu de linii continue de celule sunt celulele HeLa care inițial au fost obținute dintr-un carcinom uterin de la pacienta Hanrietta Lacks.

Introducerea culturilor de celule în practica virologică a permis izolarea şi identificarea virusurilor, studierea efectului citopatogen, a mecanismelor replicării, geneticii virusurilor, oncogenezei, terapeuticii antivirale, producției de vaccinuri antivirale.

Liniile de celule permanente nu sunt folosite în producția de vaccinuri sau de produşi farmaceutici pentru a evita virusurile latente naturale, potențial periculoase pentru cei vaccinați.

Mediile pentru culturile de celule folosite curent sunt soluții apoase de substanțe nutritive (glucoză, aproximativ 13 aminoacizi esențiali, 9 vitamine, săruri minerale), un sistem tampon cu pH 7,4, penicilină 0,5 mg %, ser sanguin de vițel 5% pentru aportul de factori de creştere încă neidentificați, precum şi un indicator de pH (roşu fenol). Celulele se incubează la 37^0 C şi după aproximativ 24 – 28 ore în mediul de creştere, numărul lor se dublează.

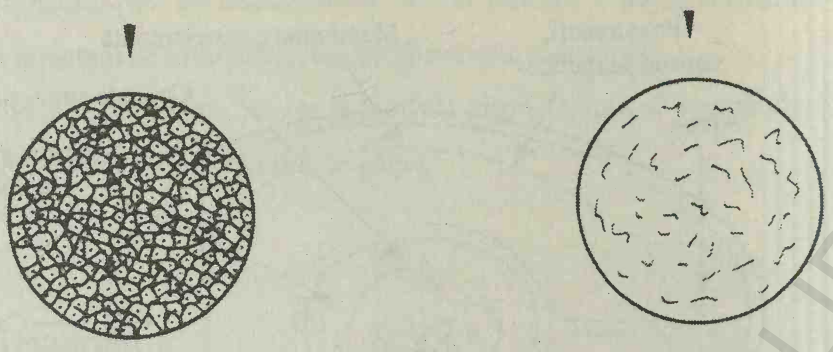
Pentru inocularea culturii de celule cu virus, mediul de creştere se îndepărtează iar pe filmul spălat se depune produsul patologic prelucrat corespunzător (îndepărtarea resturilor de celule, a bacteriilor prin centrifugare, tratarea cu antibiotice pentru prevenirea creşterii bacteriilor şi fungilor contaminanți).

După absorbția virusului pe receptorii celulari, se înlătură inoculul, iar filmul celular se acoperă cu un mediu de întreținere şi se incubează pentru replicarea virusului.

Replicarea virusului în culturile de celule se urmăreşte prin:

1. Efectul citopatic – observat la microscop. Enterovirusurile determină rotunjirea şi desprinderea celulelor de pe sticlă; virusul respirator sincițial, rujeolic, herpetic, etc. duc la formarea de sincitii (Fig.6.6).
2. Apariția unei hemaglutinine (în cazul virusurilor gripale, arbovirusurilor) care aglutinează eritrocitele unor specii de mamifere sau păsări, în condiții specifice de pH şi temperatură.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



a) b)

Fig.6.6 Efectul citopatic al virusului asupra stratului monocelular:

a) aspectul microscopic al celulelor în monostrat;

b). efectul citopatic – stratul de celule degenarat, cu resturi vizibile de celule.

3. Hemabsorbția – absorbția eritrocitelor pe membrana modificată a celulelor în care s-a replicat virusul, apare uneori înaintea efectului citopatic şi poate fi singurul mod de depistare a virusului în culturi de celule.
4. Incluziunile virale sunt acumulări paracristaline de virioni sau de componente virale, în zonele de replicare şi asamblare a virusurilor (citoplasmă, nucleu). Localizarea, forma şi afinitatea pentru coloranți a incluziunilor sunt criterii de diagnostic pentu infecția cu unele virusuri.
5. Colorația imunofluorescentă evidențiază antigenele virale în celulele infectate.
6. Interferența virală. Sunt virusuri care nu produc efect citopatic (adenovirusuri, virusul rubeolic) şi se evidențiază prin incapacitatea celulelor infectate de a replica un virus sigur citopatogen.
7. Transformarea celulelor normale în celule canceroase printr-un virus oncogen se traduce prin pierderea inhibiției de contact cu zone de aglomerări celulare.

Cultivarea pe țesuturile embrionului de găină

Inițiată de Rous (1911) şi perfecționată ulterior, cultivarea pe oul embrionat de găină permite obținerea unor cantități mari de virusuri animale.

Ouăle de găină, cu embrioni în vârstă de 6 – 14 zile sunt inoculate în cavitatea alantoidiană sau amniotică în sacul vitelin şi incubate la 35^0 C timp de 2 – 5 zile, după care se refrigerează peste noapte la 4^0 C pentru a evita hemoragia în cursul recoltării lichidelor, membranelor şi țesuturilor embrionare (Fig.6.7).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

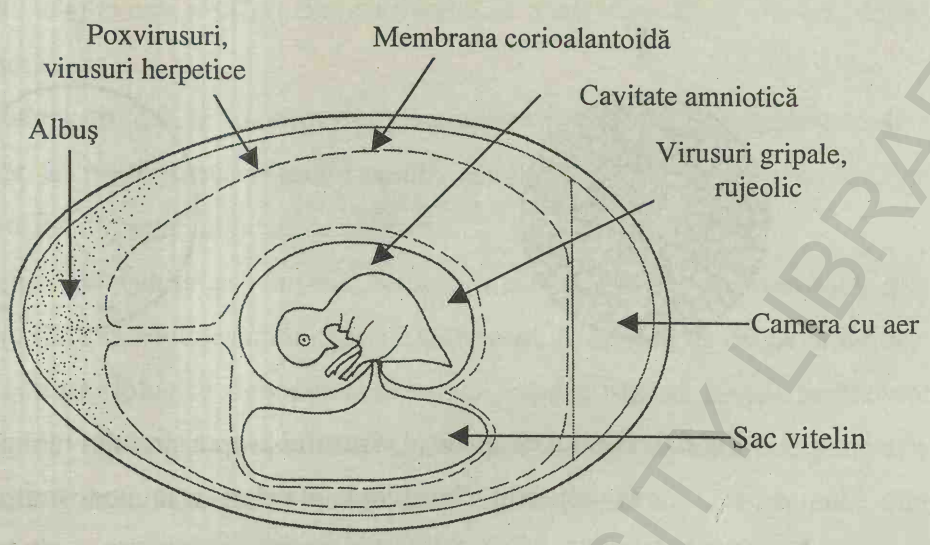


Fig.6.7 Inocularea oului embrionat

Creşterea virusului în embrionul de găină, duce la moartea acestuia, apariţia de pustule pe corioalantoidă, acumularea de hemaglutinine în lichidul alantoidic sau amniotic.

Utilizarea animalelor de laborator

Izolarea virusului pe animale de laborator se face numai când alte gazde de laborator nu au receptivitae satisfăcătoare. Multiplicarea virusului este demonstrată prin: boala sau decesul animalului, prezenta virusului în organele ţintă, hemaglutinine, infecţiozitatea omogenatelor, examene histopatologice care evidenţiază leziuni inflamatorii, incluziuni virale (ex. corpusculii Babeş – Negri în neuronii infectaţi cu virus rabic).

Cuantificarea virusurilor

Reacţia de hemaglutinare se efectuează în plăci din material plastic cu godeuri. Peste un volum cu diluţii duble ale suspensiei virale se adaugă un volum din suspensia de hematii sensibile. După 60-90 minute de incubare în condiţii adecvate se citeşte rezultatul:

- reacţie pozitivă: hematiile aglutinate se depun "în umbrela" pe suprafaţa godeului;
- reacţie negativă: hematiile se depun "în buton" pe fundul godeului.

Metoda plajelor. Se inoculează culturi de celule în monostrat cu diluţii ale suspensiei virale. După adsorbţia inoculului, filmul celular este acoperit cu mediu de întreţinere agarizat care împiedică răspândirea virusului între celule. După incubare câteva zile, virusul care s-a replicat în celulele care l-au adsorbit va infecta numai celulele învecinate şi apar astfel zone restrânse de

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

infecție cu efect citopatic, care se deosebesc de filmul normal şi pot fi numărate cu ochiul liber. Cantitatea de virus infectant se măsoară în *unități formatoare de plaje*.

Poxvirusurile şi virusul herpetic pot fi evaluate şi prin numărul de pustule (poxuri) prezente pe membrana corioalantoidă a embrionului de găină.

Replicarea virusurilor

Multiplicarea virusurilor are loc exclusiv în celulele-gazdă vii în care îşi introduc informația propriului genom şi deviază metabolismul acestora în direcția sintezei proteinelor şi acidului nucleic viral. Metabolismul celular poate fi dirijat total spre replicarea virusurilor (producerea de noi copii de genom viral urmată de incapsidarea lor într-un înveliş proteic) sau activitățile proprii celulei gazdă continuă paralel cu sinteza componentelor virale.

Principalele etape în replicarea virală sunt aceleaşi pentru toate virusurile:adsorbția, penetrarea şi decapsidarea virionului în celula gazdă, biosinteza proteinelor precoce, replicarea genomului viral, biosinteza proteinelor tardive, morfogeneza virionilor şi eliberarea virionilor progeni din celulă (Fig.6.8).

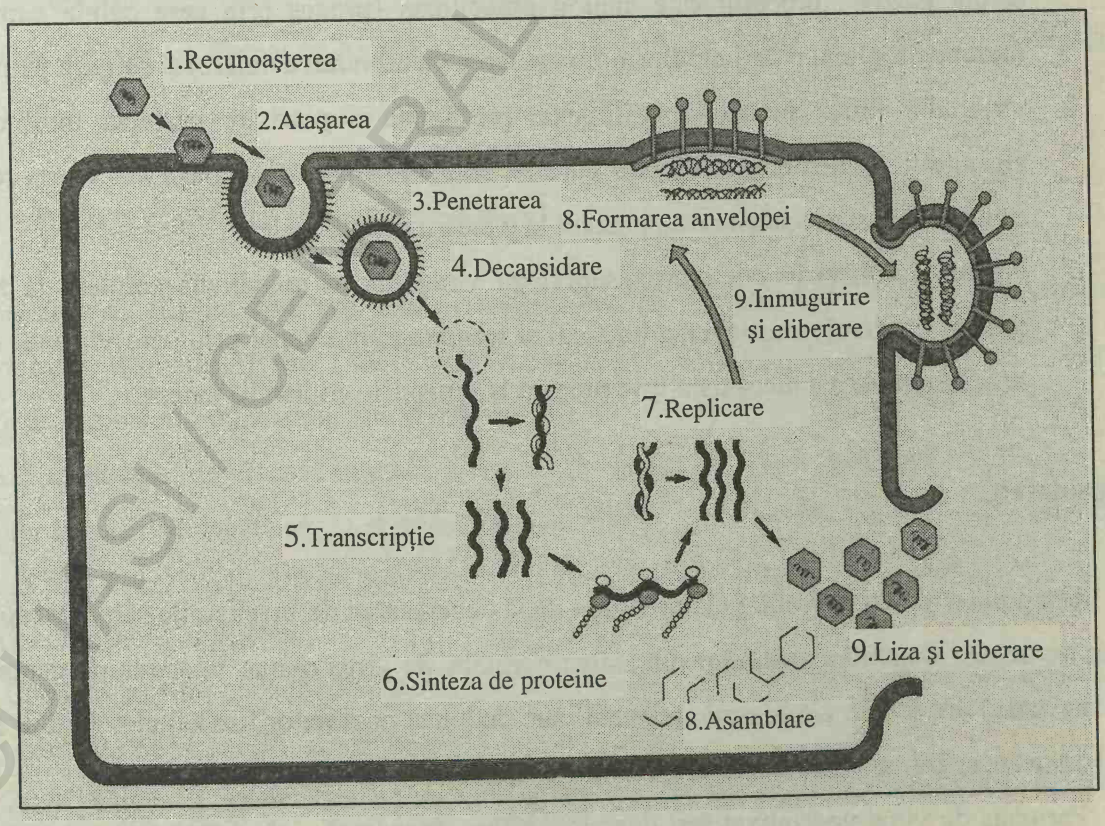


Fig.6.8 Schema generală a replicării (după Murray, 1990)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Adsorbția virusurilor pe celula gazdă

Pentru a pătrunde în celulă virusul trebuie să posede unele structuri speciale situate pe suprafață (anumite capside sau peplomere) care să recunoască receptorii celulari: glicoproteine, receptori specifici de virus). Dacă experimental se utilizează pentru infectare doar acidul nucleic pur al unui virus; pentru a evita fixarea specifică, eficiența infectării scade, dar crește gama celulelor receptive la acel virus.

Celulele vegetale nu au receptori de virus, de aceea virusurile plantelor nu au specificitate de fixare.

Virusul, după o fază de adsorbție nespecifică reversibilă, determinată de atracția ionică, se adsoarbe specific ireversibil pe celulă.

Pătrunderea virusului în celulă

Faza de pătrundere a virusului în celula gazdă are loc prin mecanisme care diferă la celulele vegetale şi bacterii de celule animale, care nu au perete celular. Pătrunderea în celulă a virionului se poate realiza prin două mecanisme*: endocitoza şi fuziunea.*

1. *Endocitoza (viropexia)* este mecanismul principal de înglobare a virusurilor animale în celula gazdă , procesul este analog pinocitozei (proces prin care celula captează şi înglobează picături de lichid prin învaginarea membranei celulare) şi asigură pătrunderea virionului intact în celulă. Viropexia presupune o potrivire perfectă între conturul virionului şi membrana celulară care se realizează prin recunoaşterea virion-receptori celulari. Acest mecanism este prezent la toate virusurile nude.
2. *Fuziunea* constă în contopirea suprafeţei virusului cu membrana celulară la zona de contact cu dizolvarea învelişului viral şi formarea unui canal prin care virionul trece în citoplasmă. Acest mecanism este prezent la virusurile cu înveliş extern.

Decapsidarea

Genomul viral îşi exercită funcţia numai după debarasarea de învelişurile sale. Decapsidarea (proces de trecere treptată a virionilor din starea normală, de virus matur, în starea de genom liber virus vegetativ) are loc în citoplasmă, probabil sub acţinuea enzimelor lisosomale. Acidul nucleic eliberat este accesibil enzimelor care asigură transcripţia, translaţia sau replicarea.

Perioada de virus vegetativ a fost descrisă ca faza de eclipsă - de dispariţie a virusului - de fapt o stare a virusului care îl face mai greu de evidenţiat, deoarece acidul nucleic izolat iniţiază mai

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

puțin infecția, comparativ cu virusul matur. Deplasarea acidului nucleic viral are loc spre locul de replicare: citoplasmă sau nucleu.

Biosinteza proteinelor precoce

După decapsidare genomul viral poate iniția procesul de biosinteză a constituienților virali, în trei etape succesive:

- biosinteza proteinelor precoce;
- replicarea genomului viral;
- biosinteza proteinelor tardive.

Proteinele precoce sau timpurii îndeplinesc mai multe funcții: inhibă sinteza ADN, ARN şi a proteinelor celulei gazdă, modificând specificitatea sistemelor de replicare, transcriere şi traducere a informației genetice celulare, încât informația genetică virală este prelucrată prioritar față de cea a gazdei, formează matricea incluziunilor citoplasmatice sau nucleare în care are loc replicarea acidului nucleic viral şi are loc morfogeneza virionilor, rol de proteine enzimatice (ARN sau ADN – polimeraze, nucleaze, ADN – ligaze) implicate în replicarea acidului nucleic viral; de proteine caspidare (excepțional), proteine care pot iniția replicarea ADN, proteine de legare a ADN (*DNA – binding proteins*).

Transcripția cu formarea ARNm pentru sinteza proteică precoce diferă cu tipul de acid nucleic viral.

Sinteza ARNm şi replicarea genomului viral

Sinteza de ARNm viral reprezintă o etapă esențială în replicarea virală. Spre deosebire de celula normală în care ARNm (ARN care se fixează pe ribosomi pentru traducerea mesajului genetic) este transcris după modelul ADN, în celulele infectate cu virusuri; acest mecanism se realizează după tipul de virus şi în special funcție de natura materialului genetic: ADN sau ARN, monocatenar sau dublucatenar şi funcție de polaritatea materialului genetic. Convențional se consideră că ARNm are polaritate pozitivă "+" . Genomul ARNm.c. se poate combina cu ribosomi celulari putând servi ca ARNm.

În cazul acizilor nucleici dublucatenari, cu o catenă "+" şi una "-" , catena "+" este cea care conține secvența de baze echivalantă cu cea a ARNm.

Acizii nucleici monocatenari au catena fie cu polaritate "+" (identică cu ARNm) fie complementară acesteia (virusuri cu genom "-").

BCU "I.C. BRĂTIANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Virusurile cu genom ADN mc "+" trec sub controlul unei enzime ale celulei gazdă, printr-o formă de ADN d.c. "+" care serveşte ca matriţă pentru sinteza ARNm.

La virusurile cu genom ARNm.c., acidul nucleic este infecţios şi are simultan, două funcţii: a). poartă informaţie genetică virală şi b). acţionează ca ARNm.

La virusurile cu genom ARNm.c. "-" acesta este transcris sub acţiunea unei ARN polimeraze preformate în virion, în ARN "+" care funcţionează ca ARNm.

ARNm.c. "-" nu este infecţios, pentru că în celula animală nu există nici un mecanism care să asigure sinteza corectă a proteinelor folosind ca model o catenă "-".

Biosinteza proteinelor tardive

Proteinele tardive, sintetizate după incetarea replicării genomului viral şi codificate de informaţia ARNm, sunt proteine structurale de capsidă, enzime virale şi alte proteine nestructurale cu rol în morfogeneza şi eliberarea virionilor din celulă.

Morfogeneza virusurilor

Morfogeneza virusurilor reprezintă procesul de ansamblare a genomurilor virale şi polipeptidelor de capsidă pentru formarea virionilor. Sinteza în exces a proteinelor virale poate duce la ansamblarea unor capside goale.

În cazul virusurilor mari, ansamblarea presupune o anumită succesiune în adiţia diferitelor proteine. Proteinele virusurilor mici se pot lega spontan, formând o structură organizată printr-un proces de autoansamblare.

Funcţie de virus, replicarea şi ansamblarea are loc în citoplasmă sau nucleu. Ribovirusurile, se replică şi se ansamblează în citoplasmă, cu excepţia virusului gripal la care genomul se transcrie în nucleu, proteinele se sintetizează în citoplasmă, iar nucleocapsida se ansamblează în nucleu şi trece în citoplasmă.

Dezoxiribovirusurile îşi replică genomul în nucleu, proteinele sunt sintetizate în citoplasmă, iar virionii se ansamblează în nucleu. Excepţie fac poxvirusurile care sint replicate şi ansamblate în citoplasmă.

Eliberarea particulelor virale din celulă

În general virusurile mici sunt eliberate mai uşor decât cele mari.

Eliberarea virusurilor nude se poate face exploziv şi rapid prin liza celulei gazdă sau sunt

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

eliberate prin exocitoză; virionii sunt incluşi într-o veziculă intracitoplasmatică, derivată din membrana citoplasmatică care ulterior fuzionează cu membrana din care s-a format.

Virusurile învelite sunt eliberate după inmugurire în arii ale membranei celulare. Printr-o deschidere apărută în membrana celulară virusul iese învelit în membrana internă a celulei. Înmugurirea nu ese dăunătoare celulei-gazdă, deoarece membrana se reface. În unele infecţii (oreion, rujeolă) celulele infectate păstrează aspectul normal şi se pot multiplica mai multe generaţii, în timp ce virionii înmuguresc pe suprafaţa lor.

Formarea învelişului viral presupune încorporarea unor proteine specifice virale în membrana celulară. Glicoproteinele virale care vor forma spiculele virionului se inseră în membrana plasmatică celulară, înlocuind proteinele normale, preexistente devenind proeminente la suprafaţă.

Relaţii între virus şi celula gazdă

Interacţiunile virus – celulă gazdă au fost studiate prin utilizarea culturilor de celule.

Infecţia virală productivă, citocidă are loc când în celula gazdă informaţia genetică virală este exprimată integral, asigurând evoluţia întregului ciclu de multiplicare a virusului (efect citocid). Celulele care permit exprimarea integrală a mesajului genetic cu replicarea şi producerea de virioni, se numesc celule permisive şi provin de regulă de la speciile pe care virusul le infectează în mod normal în natură. Sub aspectul relaţiei virus-organism gazdă, infecţia productivă corespunde infecţiilor acute, aparente sau inaparente (gripa, rujeola, poliomielita).

Infecţia virală persistentă

Celulele infectate nu prezintă modificări metabolice profunde şi pot supravieţui timp îndelungat cu producerea continuă sau intermitentă de virus matur sau de componente virale (capside, genom). Sunt trei tipuri de infecţii persistente:

a. *Infecţia abortivă*. celula gazdă nu permite multiplicarea virusului (celulă nepermisivă) sau informaţia genetică virală nu se exprimă integral pentru ca virionii infectanţi sunt mutanţi defectiv genetic.
b. *Infecţia echilibrată*: toate celulele sunt infectate şi produc continuu virus necitocid.
c. *Infecţii integrate*. Virusul cu ADN sau copii ale unor virusuri ARN (retrovirusuri) se pot integra ca provirus în genomul celulei gazdă şi pot persista timp îndelungat fără a-şi exprima genele virale.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În timp, funcție de virus se pot produce:

- Transformarea malignă a celulei gazdă: integrarea determinanților genetici virali răspunzători de transformarea malignă, în cromosomul celulei sensibile, este urmată de modificări profunde ale celulelor care se exprimă prin apariția de tumori maligne.
- Manifestarea infecției, după o perioadă de incubare indelungată, prin exprimarea în totalitate a genomului viral, cu producerea de virus infecțios (ex. virusul imunodeficienței umane).
- Reactivări ocazionale, uneori repetate, ale infecției prin exprimarea integrală a genomului viral (virusul herpes simplex, varicela-zoster, citomegalovirus). Corespunzătoare acestei relații sunt infecțiile virale latente.

Calsificarea virusurilor

Sistemul de clasificare al celor peste 1 000 virusuri animale identificate până în prezent, are la bază caractere cum sunt: natura genomului (ARN sau ADN), particularitățile fizico-chimice ale acestuia (greutate moleculară, mono sau dublucatenar, linear, circular, segmentat, raportul de baze C + G%), simetria capsidei (helicală, icosaedrică sau complexă), mărimea virionului, numărul capsomerelor, prezența sau absența învelișului extern, locul de ansamblare a capsidei, particularități de replicare, proprietăți antigenice.

Pe baza acestor criterii, virusurile au fost grupate în familii subdivizate în genuri.

Comitetul Internațional de Taxonomie a Virusurilor a recomandat nomenclatura latinizată. Genul este considerat ca un grup de virusuri cu caractere comune şi sunt individualizate prin adăugarea sufixului – virus la numele virusului (ex. *Herpesvirus, Adenovirus*). Familia este un grup de genuri cu caractere comune şi se desemnează prin adăugarea sufixului – viridae (ex. *Herpesviridae, Adenoviridae*).

Virusurile patogene pentru om sunt grupate în 19 familii (Tabel 6.1).

În practică se folosesc şi denumiri vernaculare sub forma unor combinații de litere şi numere (ex. Virusul SV40 – Simian vacuolant).

În virologia medicală se folosesc denumiri comune ale virusurilor bazate pe numele bolii determinate (ex. virusurile gripale, virusul rujeolic, virusul rubeolic), localizarea sau poarta de intrare a infecției (ex. enterovirus), modul de transmitere (ex. *arbovirus*, de la *Arthropod borne viruses* – care include virusuri transmise prin intermediul artropodelor hematofage).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 6.1 Principalele virusuri cu importanța în patologia umană

Familia	Exemple	Tipul de acid nucleic	Anvelopa	Simetria capsidei
Picornaviridae	Virusul polio	ARN	Nu	Icosaedric
Calciviridae	Virusul Norwalk	ARN	Nu	Icosaedric
Togaviridae	Virusul rubeolic	ARN	Da	Icosaedric
Flaviviridae	Virusul febrei galbene	ARN	Da	Necunoscut
Coronaviridae	Coronavirusuri	ARN	Da	Elicoidal
Rhabdoviridae	Virusul rabic	ARN	Da	Elicoidal
Filoviridae	Virusul Marburg	ARN	Da	Elicoidal
Paramyxoviridae	Virusul rujeolic	ARN	Da	Elicoidal
Ortomyxoviridae	Virusul gripal	ARN	Da	Elicoidal
Bunyaviridae	Virusul encefalitei de California	ARN	Da	Elicoidal
Arenaviridae	Virusul coriomeningitei limfocitare	ARN	Da	Elicoidal
Reoviridae	Rotavirusuri	ARN	Nu	Icosaedric
Retroviridae	HIV-1	ARN	Da	Icosaedric
Hepadnaviridae	Virusul hepatitei B	ADN	Da	Necunoscut
Parvoviridae	Parvovirusul uman B-19	ADN	Nu	Icosaedric
Papovaviridae	Virusul JC	ADN circular	Nu	Icosaedric
Adenoviridae	Adenovirusuri umane	ADN	Nu	Icosaedric
Herpesviridae	Virusul herpes simplex	ADN	Da	Icosaedric
Poxviridae	Virusul vaccinei	ADN	Da	Complex

Patogeneza

Simptomele şi semnele bolii reprezintă punctul culminant al interacțiunii între virus şi gazdă. Virusul trebuie să pătrundă în interiorul gazdei, să se replice şi să se răspândească în țesuturile țintă. Pentru a transmite virusul infecțios altei gazde, acesta trebuie să învingă sau să evite răspunsul imun al gazdei şi mecanismele de apărare ale celeilelte gazde. O replicare virală masivă poate avea loc înainte ca semnele şi simptomele bolii clinice să fie detectate. Perioada de incubație poate dura de la câteva zile (gripa), săptămâni (rujeola, varicela) la câțiva ani (virusurile lente).

Numeroase boli virale se instalează prin expunerea la virusuri exogene. In unele cazuri boala se manifestă în urma reactivării virusurilor endogene, latente în interiorul celulelor gazdă specifice (herpes-zoster, herpes simplex, citomegalovirus).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In majoritatea cazurilor, transmiterea bolilor virale apare între membrii unei populații susceptibile (diseminare orizontală) sau când fătul se infectează în uter: diseminare verticală (HIV – human immunodeficiency virus, virusul rubeolic, virusul herpes-simplex, virusul varicelo-zosterian, virusul hepatitei B).

Vârsta şi statusul nutrițional inadecvat, pot creşte susceptibilitatea la infecții.

Un număr mare de virusuri pătrund în organism prin traversarea barierelor mucoase ale tractusului respirator sau gastrointestinal. Infecțiile respiratorii pot fi transmise prin picături mici de secreții nazale şi salivă. Pentru a intra în organism, pe cale respiratorie sau enterică, virusul trebuie să învingă o serie de mecanisme de apărare ale gazdei. Celulele ciliate ale epiteliului respirator aduc continuu mucusul dinspre tractusul respirator inferior. Aciditatea gastrică mare inactivează virusurile labile în mediul acid; sărurile biliare prezente în intestinul subțire por distruge anvelopa lipidică a multor virusuri.

Transmiterea venerianã cu intrare prin mucoasa rectală sau genitourinară este importantă pentru virusul herpes simplex tip 2, virusul hepatitic B, HIV-1.

Căile neurogenă, hematogenă şi limfatică sunt de asemenea folosite pentru a invada țesuturile țintă. Virusul rabic poate infecta muşchii şi apoi se răspândeşte prin nervii senzitivi şi motori la măduva spinării.

Căile olfactive reprezintă o modalitate a diseminării neuronale. Dendritele celulelor olfactive sunt expuse în mucoasa olfactivă şi fac sinapse direct cu celulele mitrale din bulbul olfactiv care se găseşte în sistemul nervos central. Experimental s-a demonstrat că inocularea intranazală sau prin aerosoli a virusurilor rabic, herpes simplex, polio, duce la infecția sistemului nervos central pe cale olfactivă. Aşa se explică infecțiile virale ale sistemului nervos central în condițiile în care există titruri crescute în aerosoli, ca în peşteri în care sunt prezenți lilieci turbați, sau infecțiile dobândite în accidentele de laborator.

Diseminarea hematogenă este importantă pentru numeroase virusuri. Virusurile sanguine pot circula libere în plasmă (virusul hepatitei B, togavirusurile) sau asociate cu elemente celulare (virusul febrei căpuşei de Colorado, virusul rubeolic, HIV).

Viroizii

Viroizii sunt agenți infecțioşi subvirali formați din mici molecule de ARN nud, care se replică şi produc unele boli ale plantelor (cartofi, crizanteme, hamei, cocotieri, etc.).

Viroizii sunt sensibili la digestia cu ribonuclează şi rezistenți la tratamentul cu solvenți organici, fenol.

Rezistența la ultraviolete este de 70 – 90 ori mai mare decât a virusurilor, probabil datorită dimensiunilor foarte mici ("ținta" are volum foarte mic).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Chemoterapia antivirală

Bacteriile sunt vulnerabile la acţiunea agenţilor chemoterapeutici, deoarece există numeroase deosebiri metabolice şi structurale între celula acestora şi celula animală. Replicarea virală, care depinde de metabolismul energetic, sistemul enzimatic şi de biosinteză a proteinelor celulei gazdă, limitează acţiunea selectivă a agenţilor antivirali. De asemenea, multe manifestări ale infecţiei virale apar după multiplicarea masivă şi distrugerea celulei gazdă.

Acyclovirul este un agent netoxic pentru celula gazdă, care inhibă specific replicarea virusului herpetic.

In general acyclovirul este bine tolerat şi lipsit de toxicitate. Rar apar disfuncţii renale iar la pacienţii imunodeprimaţi afectări ale sistemului nervos (letargie şi tremur). Se elimină predominant renal. Pătrunde bine în lichidul cefalorahidian unde realizează aproxiamtiv ½ din concentraţia plasmatică.

Amantadina şi rimantadina au acţiune limitată asupra virusului gripal A (interferă cu decapsidarea virusului după infectarea celulei). Se administrează oral; reacţii adverse minore care interesează sistemul nervos central: ameţeală, anxietate, insomnie şi dificultăţi de concentrare.

Ribavirina este un analog nucleozidic sintetic care inhibă lanţurile de ADN şi ARN viral. Administrat în aerosoli, medicamentul este indicat în tratarea infecţiilor determinate de virusul sincitial respirator (VSR).

Ganciclovirul este un analog al acyclovirului, activ asupra virusurilor herpetice şi citomegalovirus (prin inhibarea ADN polimerazei virusului citomegalic).

Foscarnetul este un pirofosfat care conţine componente inhibitoare pentru virusurile herpetice, inclusiv citomegalovirus. Este folosit pentru virusurile retinitelor cu citomegalovirus la pacienţii cu SIDA.

Prezintă toxicitate renală şi această funcţie va fi atent supravegheată. Deoarece leagă ionii metalelor divalente, pot apărea hipocalcemie, hipomagnezemie, hipopotasemie.

Zidovudina inhibă replicarea HIV prin inhibarea competitivă a revers transcriptazei şi prin blocarea sintezei lanţurilor de ADN viral.

Didanozin şi Zalcitabina sunt analogi nucleozidici cu activitate antivirală asupra HIV-1 şi HIV-2, prin inhibarea revers-transcriptazei virale şi al alungirii lanţurilor de ADN . Ca reacţii majore adverse se semnalează pancreatita şi neuropatia periferică.

Vidarabina este un analog al nucleozidelor purinice cu acţiune asupra virusurilor herpes simplex 1 şi 2, herpes zoster; inhibă sinteza ADN viral. In doze mari poate da afecţiuni hematologice (anemie, leucopenie, trombocitopenie) şi neurotoxicitate la pacienţii cu insuficienţă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

renală sau hepatică. Unguentul oftalmic cu vidarabină (3%) este eficient în tratamentul cheratitei herpetice.

Se ştie însă că infecţia unui organism cu un virus previne infecţia cu un alt virus, fenomen numit interferenţă şi este determinat de producerea unei substanţe numită *interferon* (proteină cu greutatea moleculară mică, produsă de celula infectată cu virus). Interferonul se fixează pe membranele celulare şi induce sinteza unei proteine secundare care inhibă acidul nucleic viral şi sinteza proteinelor. Utilizarea interferonului în terapia infecţiilor virale este limitată de o serie de factori printre care specificitatea de specie: interferonul produs în celulele animale oferă protecţie limitată pentru celulele umane.

Obţinerea interferonului uman în cantităţi mari este dificilă dar problema a fost rezolvată prin inserţia genei pentru interferon în genomul *E. coli*.

Virusul imunodeficienţei umane (Human immunodeficiency virus, HIV)

HIV este un virus cu ARN, cu anvelopă, care se transmite prin secreţii genitale şi sânge. De la locul infecţiei virusul ajunge în ganglionii limfatici unde se replică intens în celulele gazdă-limfocitele CD4. Perioada de latenţă poate fi de 1-15 ani (sau mai mult) după care apar simptomele clinice. Numărul celulelor CD4 din sânge scade şi când ajung sub 200-400/µl sistemul imun este grav afectat. Infecţiile secundare cu *Mycobacterium tuberculosis* sau alţi patogeni oportunişti duc inevitabil la moartea pacienţilor cu SIDA.

Prionii

Termenul de "prion" a fost introdus în 1982 de către S. B. Prusiner pentru a desemna particulele proteice infecţioase descoperite şi izolate din creier în cursul infecţiilor latente ale sistemului nervos central (boala Creutzfeld – Jakob, boala Kuru, la om, sau boala "scrapie", boala "vacilor nebune" sau encefalopatia spongiformă bovină).

Natura exactă a prionilor este încă discutată. Ar putea fi o structură proteică cu aproximativ 250 acizi aminici, cu structură fibrilară. Aceste fibrile au fost găsite în leziunile degenerative ale sistemului nervos ("plăci amiloide").

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă ar fi totuşi o structură de tip viral, dimensiunea capsidei ar avea aproximativ 5 nm, ar proteja un spaţiu interior redus, care ar conţine un acid nucleic cu doar 50 de baze, şi nu ar putea codifica decât 12 aminoacizi, în loc de 250 cât au fost identificaţi în proteinele prionilor.

Prionii nu sunt atacaţi de substanţe care alterează proteinele: proteaze, care le hidrolizează, dezoxicolat de sodiu (care le denaturează), dietilpirocarbonat (care induce modificări conformaţionale ale structurii terţiare).

De asemenea, substanţele care alterează acizii nucleici nu inactivează şi proteinele prionilor: nucleaze, radiaţii UV, hidroxilamina.

Se cunoaşte că există o proteină cu structură similară proteinei prionilor, care este produsă normal de celula neuronală a gazdei. Diferenţa între ele este de ordin funcţional: proteina prionilor alterează procesul de sinteză a proteinei celulare, conducând la sinteza proteinei prionice, neutilizabile care se acumulează în celulă. Asemănarea structurală a celor două proteine explică absenţa răspunsului imunitar al subiectului infectat.

Transmiterea interumană este directă sau indirectă, (prin grefe de cornee, dura-mater, timpan, prin hormoni de creştere, intervenţii neurochirurgicale în cursul cărora se foloseşte instrumentar contaminat), prin tehnici de laborator de anatomo-patologie.

Transmiterea interspecifică este posibilă şi pune problema precauţiilor care trebuie luate în situaţiile de contact cu animalele care trăiesc în preajma omului, sau pe care le utilizează în alimentaţie. Procedeele de decontaminare a materialelor de uz medical sunt puţine şi necontrolabile. În Tabel 6.2 sunt prezentate procedeele fizico-chimice de inactivare a prionilor.

Este necesară găsirea unor procedee eficiente de decontaminare a implanturilor (cornee, dura – mater, timpan) şi a instrumentarului chirurgical.

Tabel 6.2 Sensibilitatea prionilor la procedeele fizico-chimice de inactivare

Inactivate de: - hipoclorit de sodiu (2%) - uree 8M - fenol	- NaOH 1N - Căldura umedă > 135^0 C
Fără acţiune: - solvenţi organici - alcooli (etanol, metanol) - oxid de etilenă - formol - glutaraldehidă - peroxid de hidrogen (H_2O_2)	- iodofori - acid peracetic - β - propiolactonă - raze UV - ultrasunete

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

Hayden FC, Douglas RG. *Antiviral agents.* In: Principles and Practice of Infections Diseases. Eds: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Willy Medical Publication, New York, 270-286, 1988.

Murray PR, Derw DL, Kobayashi GS, Thompson JM. *Medical Microbiology*, Ed. Mosby, 439-685, 1990.

Norkin LC. *Virus receptors-implications for pathogenesis and the design of antiviral agents.* Clin Microbiol Rev. 8: 293-315, 1995.

Prusiner SB. *Molecular biology and pathogenesis of prion disease.* Trends Biochem Sci, 21: 482-487, 1996.

Volk WA. Basic Microbiology 7th edn. Ed. Harper Collins Publishers Inc, 205-227, 1992.

White DO, Fenner FJ. *Medical Virology*, 4th edn. San Diego: Academic Press, 1994.

Zarnea G. *Tratat de Microbiologie Generală.* Ed. Academiei Române, Bucureşti, V2, 1984.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7

Levurile şi mucegaiurile

Levurile (drojdiile) sunt unicelulare, se multiplică prin înmugurire şi produc fermentaţii.

Mucegaiurile sunt formate din filamente care apar ca o masă pulverulentă. Levurile şi mucegaiurile sunt cunoscute sub denumirea de fungi şi au importanţă farmaceutică.

Saccharomyces cerevisiae este cea mai studiată celulă eucariotă. Mucegaiul verde *Penicillium digitatum*, care contaminează fructele (mere, citrice) şi *Neurospora crassa* (prezent pe pâine) sunt cele mai cunoscute. În schimb *Cryptococcus neoformans*, care posedă numeroase mecanisme de apărare contra sistemului imunitar, este mai puţin studiat.

Levurile şi mucegaiurile sunt omniprezente în mediu, în hrană, fac parte din flora normală a omului, dar toate pot contamina produsele farmaceutice sau determina infecţii post-chirurgicale.

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae ocupă un loc predominant în domeniul biologiei celulare şi moleculare, fiind considerată ca model universal pentru celula eucariotă, care poate fi manipulat genetic. Importante pentru industria alimentară, fiziologia şi biochimia levurilor a fost bine studiată.

În 1996 au fost identificate secvenţele nucleotidice ale întregului genom şi a fost posibilă identificarea genelor provenite de la alte organisme prin metoda complementării genetice în *S. cerevisiae*.

Ciclul de viaţă la *S. cerevisiae* este prezentat în Fig.7.1.

Celula poate exista în formă haploidă (o copie a cromozomului în fiecare celulă) sau diploidă (două copii ale cromozomului per celulă). Celulele haploide există sub forma unuia din cele două sexe: tip *a* şi tip α.

Reproducerea asexuată se realizează prin înmugurire. Pe suprafaţa celulei apare o proeminenţă care creşte până atinge dimensiunile celulei mamă, după care are loc diviziunea nucleului şi între cele două celule de formează un perete despărţitor. Celula nou rezultată poate rămâne ataşată de celula mamă şi continuă înmugurirea, formând microcolonii.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Într-o anumită etapă a celulei vegetative, înmugurirea încetează şi celula se transformă în asca cu patru spori haploizi. Ascosporii haploizi germinează şi formează celule vegetative haploide, care fuzionează pentru a forma celule diploide. Forma diploidă se păstrează pe toată durata creşterii vegetative, încât *S. cerevisiae* există de fapt sub formă diploidă.

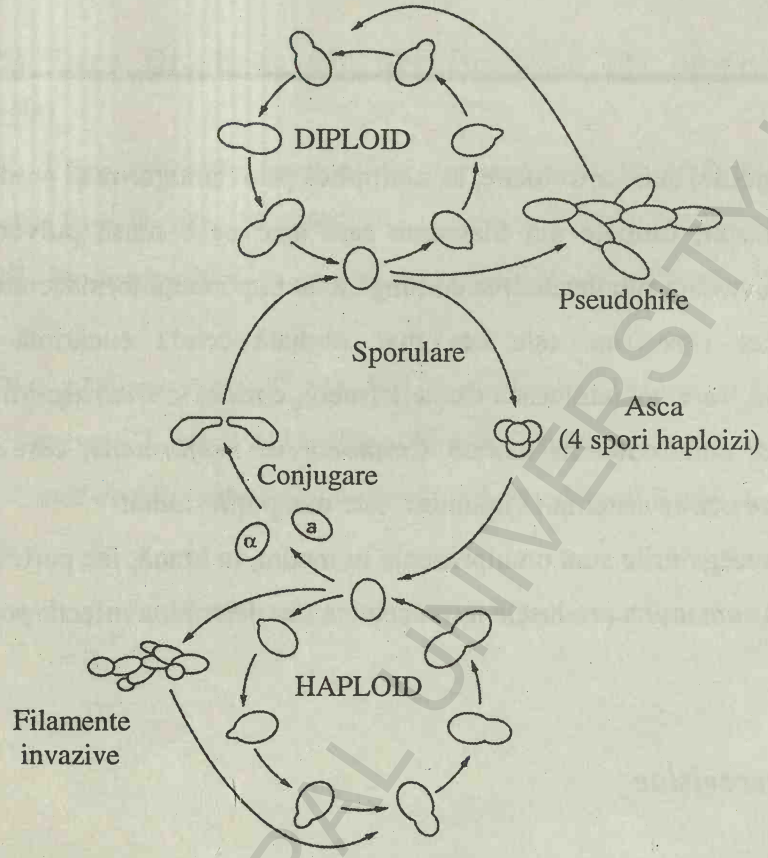


Fig.7.1 Ciclul de viaţă la *Saccharomyces cerevisiae*

O celulă haploidă se cuplează numai cu o celulă haploidă de sex opus. Acest lucru este posibil prin prezenţa unor feromoni (hormoni care determină modificări ale comportamentului în celula de sex opus) şi prezenţa pe suprafaţa celulei a receptorilor pentru feronomonul opus (ex. celula de tip a produce factorul *a* şi are receptori pentru factorul α).

Ascosporii haploizi sunt mai rezistenţi la căldură, solvenţi, uscăciune, comparativ cu celulele vegetative.

Metabolism şi fiziologie

Saccharomyces cerevisiae este facultativ anaerob, care poate prolifera în condiţii de aero şi anaerobioză. Poate utiliza numeroase mono-, di- şi oligosaharide, etanol, acetat, glicerol, piruvat, lactat.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sursa de carbon preferată este glucoza şi calea metabolică cea mai folosită este fermentaţia, cu utilizarea căii Embden-Meyerhof, şi formare de etanol. În prezenţa glucozei, sinteza enzimelor necesare pentru disaharide (sucroza şi maltoza) sau utilizarea galactozei ca şi dezvoltarea mitocondriilor, sunt represate. Când concentraţia substratului represor începe să scadă (<0,2% glucoză) celula începe să se "derepreseze": mitocondriile devin mai numeroase, ele fiind sediul metabolismului energetic şi oxidativ al ciclului Krebs, a sistemului citocromic.

În procesul de formare a sporilor se stochează cantităţi mari de trehaloză, care conferă sporilor abilitatea de a rezista la deshidratare. Numeroase organisme în condiţii de uscăciune, utilizează acelaşi mecanism (plante, insecte). Compusul este adăugat la numeroase produse medicale şi farmaceutice (plasmă, produse pe bază de sânge). Trehaloza previne faza de tranziţie prin membrană.

Proliferarea acestui flexibil organism, are loc în anaerobioză, numai în urma acumulării de acizi graşi nesaturaţi şi sterol, necesari pentru formarea membranelor. Numeroase levuri (mutante auxotrofe) necesită ergosterol; unele mutante au fost obţinute pe baza rezistenţei la antibioticul polienic nistatină.

Antibioticele polienice alterează permeabilitatea membranei prin interacţiunea cu sterolii din membrană.

Peretele celulei

Ca şi alţi fungi, pertele celulei la *S. cerevisiae* este foarte tare, flexibil şi elastic, stratificat, constituit din trei componente principale:

1. O reţea internă de glucan;
2. O reţea externă de mananproteine;
3. Chitina care ocupă diferite spaţii.

Compoziţia peretelui variază funcţie de condiţiile fiziologice şi stadiul de dezvoltare. Astfel, celulele în faza staţionară au peretele mult mai rezistent la acţiunea beta-glucanazei, decât celulele în faza exponenţială. Multe din mananproteine pot fi eliberate numai după degradarea enzimatică a reţelei de glucan.

Candida albicans

Importanţa farmaceutică şi clinică

Candida albicans face parte din flora normală a omului şi pentru majoritatea persoanelor sănătoase nu crează niciodată probleme.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecţiile cu *C. albicans* apar la gazde cu sistemul imunitar compromis (pacienţi cu SIDA, transplant de organe, diabet, leucemie).

La microscop apare ca celule ovale, înmugurite, Gram-pozitive. Candida creşte rapid la 25-37^{0}C, pe medii simple. In mediile de cultură complexe formează hife sau structuri ramificate, numite pseudohife.

Candidoza oro-faringiană (mărgăritărelul) apare mai ales la sugari. Pe mucoasa afectată se constată depozite albe sau cenuşii, aderente formate din pseudomicelii şi epiteliu descuamat.

Candidoze viscerale (afectarea plămânului, a rinichilor, meningelui, encefalului) sunt posibile la pacienţii imunosupresaţi şi leucemici.

Compuşii antifungici azolici sunt frecvent utilizaţi, dar pot bloca metabolismul ciclosporinelor (aplicate în terapia imunosupresiei cronice) şi în acest fel cresc imunosupresivitatea.

O alternativă ar putea fi utilizarea amfotericinei B, în candidoza diseminată dar şi aceasta interacţionează cu ciclosporinele şi creşte nefrotoxicitatea.

Cryptococcus neoformans

Este o levură prezentă frecvent în sol, capsulată şi determină infecţii ale sistemului nervos central; bolnavii mai pot prezenta leziuni cutanate, osoase sau viscerale. Meningitele cu *Cryptococcus* sunt foarte frecvente la pacienţii cu SIDA, atunci când numărul limfocitelor CD4 este sub 200 mm^3.

Nu formează hife sau pseudomiceliu; celulele sunt sferice şi pot produce o capsulă mare, polizaharidică. Infecţia este dobândită prin inhalarea fungilor care ajung în plămân; în alveolele pulmonare se multiplică şi eliberează polisaharide şi glicoproteine care, ajunse în torentul sanguin, constituie factori de virulenţă.

Produşii capsulari determină pierderea L-selectinei de pe suprafaţa neutrofilelor, care este necesară pentru ataşarea leucocitelor de celulele endoteliale înaintea deplasării din sistemul sanguin spre ţesuturi. Dacă leucocitele nu pot ajunge la locul infecţiei în ţesuturi, levurile sunt salvate.

Pacienţii cu SIDA şi criptococoză sunt iniţial trataţi cu amfotericină B administrată intravenos şi apoi cu fluconazol.

Blastomices dermatidis este un fung care creşte la temperatura camerei ca un mucegai alb sau maroniu, dar în ţesuturile gazdei sau la 37^{0}C creşte sub formă unicelulară, cu celule rotunde, înmugurite.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecția este dobândită prin inhalarea fungului de pe sol, vegetație descompusă sau lemn putred, în cursul activităților recreative din zone împădurite, amplasate de-a lungul unor cusuri de apă. Infecția pulmonară inițială se poate vindeca spontan sau poate deveni cronică. Rareori infecția disemineză în creier, ficat, ganglioni limfatici, splină, fără a fi evidențiată săptămâni sau ani după apariția leziunii pulmonare. Antibioticul de elecție este amfotericina B, administrată intravenos.

Histoplasma capsulatum cultivă în natură sub formă de hife care poartă atât spori mari cât şi mici. In țesuturile gazdei creşte sub formă unicelulară, cu înmuguriri.

H. capsulatum preferă suprafața solurilor umede, cu depuneri de excremente provenite de la anumite păsări, lilieci. Boala, histoplasmoza, se manifestă ca o pneumonie cronică fibrocavitară, sau, mai rar, ca o infecție diseminată. Evoluția acută, rapid fatală este posibilă în cazul copiilor mici şi a pacientilor imunodeprimați, inclusiv cei cu SIDA.

Ca terapie se recomandă ketoconazol, itraconazol sau amfotericină B.

Penicillium şi Aspergillus

Genul *Penicillium* are multe specii dintre care unele cu importanță industrială. *P. notatum şi P. chrysogenum* produc penicilina; alte specii sunt utilizate în industria alimentară, la prepararea brânzeturilor fine (*P. roqueforti, P. camemberti*). Specia *P. glacum* determină alterarea produselor alimentare, iar *P. italicum* degradează citricele. Rolul mucegaiurilor în descompunerea produselor vegetale este esențial pentru circuitul materiei în biosferă. Viața nu ar putea continua pe planetă în absența microorganismelor care descompun materia organică.

Speciile de *Penicillium* utilizate pentru fermentarea brânzeturilor nu produc aflatoxine.

Penicillium poate cauza infecții ale ochiului, ale tractusului respirator, urinar sau cardiace după inserția de valve artificiale.

Penicillium are conidiofori ramificați, ca nişte pensoane, pe care se găsesc sterigmele care formează conidiile mici, sferice, de culoare verde-cenuşiu; conidiile sunt eliberate şi răspândite de curenții de aer (Fig.7.2).

O caracteristică a mucegaiurilor constă în producerea de micotoxine dintre care aflatoxinele prezintă, prin acțiunea lor, un interes special.

Aflatoxina B_1 are efect carcinogen în culturile de țesuturi animale şi umane. Contaminarea cu aflatoxine a produselor alimentare, a preparatelor farmaceutice, veterinare, medicale are serioase consecințe asupra sănătății.

Aspergillus este un mucegai, cu hife septate, de aproximativ 2-4μm în diametru, conidiofori simpli cu conidii sferice dispuse în lanțuri (Fig.7.3).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

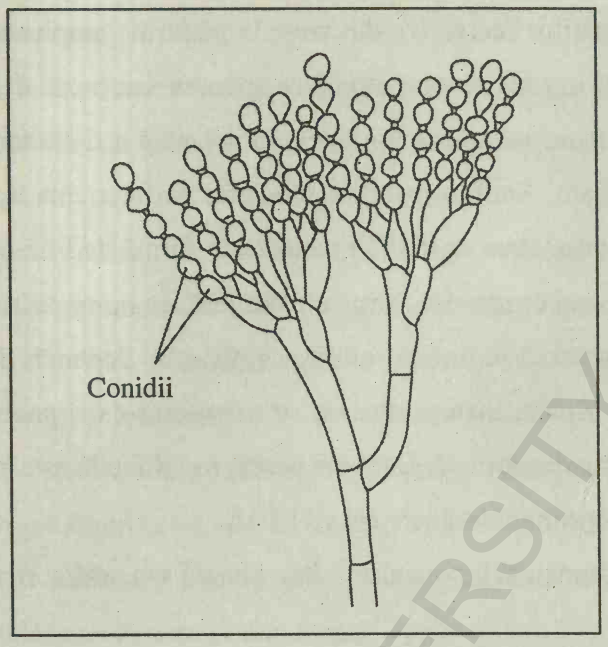


Fig.7.2 *Penicillium*

Aspergillus parasiticus şi *A. flavus* sunt producători importanţi de aflatoxine; cresc rapid şi pot contamina diferite materiale. Înfecţiile cauzate de membrii grupului sunt numite aspergiloze, care se manifestă prin alergii, invazii ale ţesuturilor şi colonizări localizate. *A. fumigatus* şi *A. flavus* sunt agenţi frecvenţi ai aspergilozei.

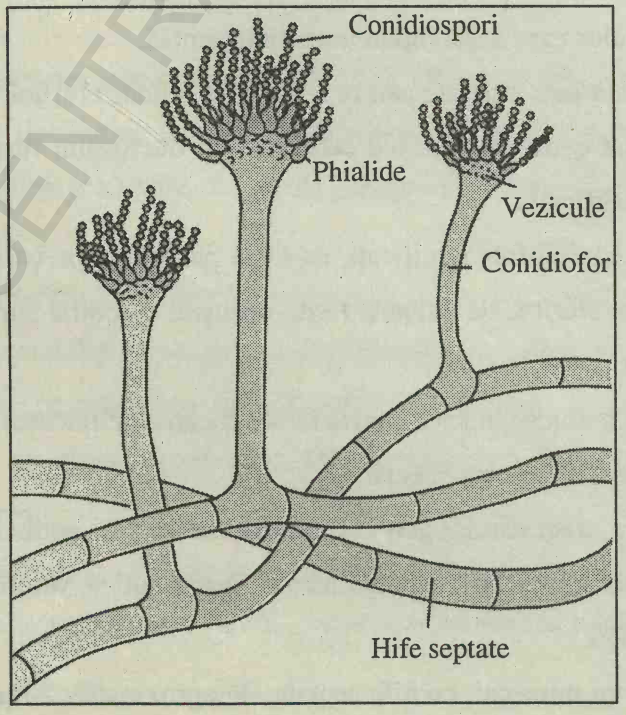


Fig.7.3 *Aspergillus*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Speciile de *Aspergillus* care produc îmbolnăvirile la om sunt ubicuitare: cresc pe vegetale în descompunere, fân, cereale depozitate. Inhalarea de spori este frecventă, dar boala este rară. Invazia țesutului pulmonar este aproape totdeauna limitată la pacienții imunodeprimați. La persoanele normale, inhalarea masivă de spori de *Aspergillus* poate duce la pneumonie acută, difuză. Amfotericina B, administrată intravenos oprește sau vindecă aspergiloza invazivă, dacă imunodepresia nu este severă.

A.oryzae este utilizat în Extremul Orient pentru obținerea prin fermentație alcoolică, a sucului de orez, băutură alcoolică numită *sake*.

Rhizopus, Rhizomucor, Mucor, Absidia au hife lungi, rar septate, cu diametrul de 6-50 μm. Hifele au la partea terminală sporangiofori în care se găsesc sporii (Fig.7.4).

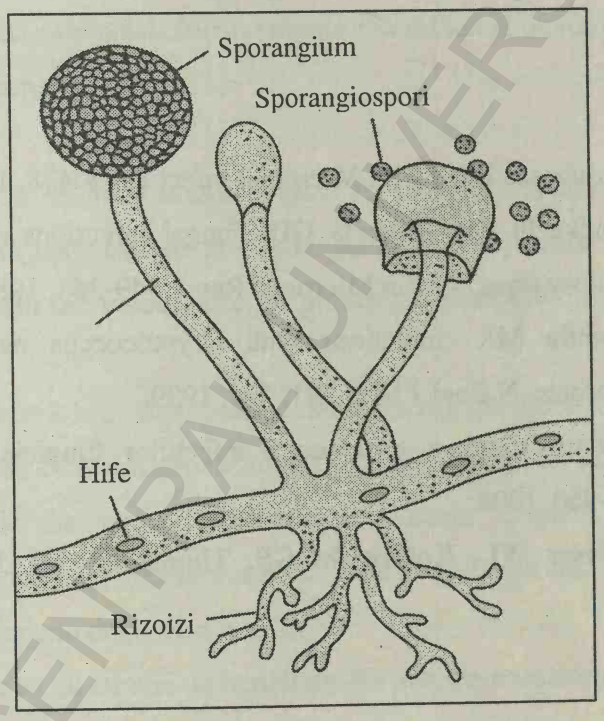


Fig.7.4 *Mucor*

Boala produsă, mucormicoza, are ca punct de plecare sinusurile paranazale şi cavitatea nazală şi apare predominant la pacienții diabetici. Amfotericina B, administrată intravenos este eficientă în diferitele forme de mucormicoză.

Epidermophyton, Microsporum, Trichophyton

Sunt dermatofiți, fungi filamentoşi care utilizează pentru nutriție *keratina*. Keratina este principala proteină din piele,păr,unghii. Toate aceste specii produc la mamifere micoze superficiale.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Microsporum atacă pielea şi părul. *M. canis* infectează copiii, pisicile şi câinii dar nu şi adulţii; *M. gypseum* afectează mai ales animalele mici; *M. gallinae* infectează puii şi omul.

Epidermophyton floccosum atacă pielea şi unghiile.

Trichophyton atacă pielea, părul, unghiile. *T. tonsurans, T. rubrum* sunt specii antropofile. *T. rubrum* infectează pielea şi unghiile dar aproape niciodată părţile acoperite cu păr ale corpului. *T. mentagrophytes* poate infecta toate regiunile corpului.

Dermatofiţiile se transmit direct, prin contact cu omul sau animalele infectate şi indirect prin haine, lenjerie de pat, obiecte de toaletă.

Frecvenţa micozelor este legată de climă, nutriţie vârstă; starea fiziologică, prezenţa animalelor în mediul de viaţă, condiţii legate de igienă.

Bibliografie

Meunier F. Candidiasis. Eur J Clin Microbial Infect Dis 8:438, 1989 .

Musial CE, Cockerill FR, Roberts GD. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. Clin Microbial Rev 1:349-364, 1988.

Chuck SL, Sande MA. Infections with Cryptococcus neoformans in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 321: 794, 1989.

Bennett JE. Diagnosticul şi tratamentul infecţiilor fungicie. In: Principiile Medicinei Interne, Ed. Teora, 950-960, 1998.

Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. Medical Microbiology, Ed. Mosby, 341-346, 1990.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8

Principii de patogenitate şi epidemiologie microbiană

Relaţia gazdă-bacterie

Bacteriile de interes medical nu reprezintă decât o infimă parte a speciilor microbiene prezente în mediu, care asigură transformarea materiei organice.

Încă de la naştere omul este plasat într-un mediu microbian şi rapid, între aceştia se stabilesc relaţii care îmbracă diverse aspecte:

a. Saprofitismul

În cadrul acestui tip de relaţie, bacteria şi omul au un comportament strict independent unul de altul. Bacteriile saprofite care trăiesc în natură pe seama deşeurilor organice, pot fi găsite tranzitoriu şi pe suprafaţa pielii sau mucoaselor, iar prezenţa lor este total inofensivă.

b. Comensalismul

Relaţia se caracterizează prin faptul că bacteria nu trăieşte decât în imediata vecinătate a celulei animale sau umane: se dezvoltă dependent de produşii metabolici celulari şi nu induc gazdei manifestări patologice. Aici se includ bacteriile obligatoriu asociate pielii sau mucoaselor (orofaringiene, intestinale, vaginale) şi care formează flora microbiană comensală.

Comensalismul presupune două aspecte:;

- Bacteria şi gazda sa nu au nici un beneficiu din această asociere;
- Amândoi sau unul din ei au un avantaj din asociere: *simbioza.*

Astfel, anumite bacterii din tubul digestiv sintetizează vitamina K, asigurând gazdei necesarul indispensabil. Bacteriile fixatoare de azot (*Rhizobium*) trăiesc în simbioză cu leguminoasele cărora le furnizează azotul anorganic.

c. Patogenitatea

Parazitul (bacteria) parazitează un alt organism de la care ia tot ce este necesar pentru existenţa sa. Parazitul "perfect" persistă fără a cauza modificări reversibile sau fatale gazdei. Uneori această relaţie se modifică, parazitul declanşând reacţiile de apărare ale gazdei ca urmare a bolii.

Capacitatea parazitului de a provoca o boală gazdei de numeşte *putere patogenă.*

Bacteriile patogene specifice produc o boală clinic definită cu fiziopatologie specifică

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(furunculoza, tuberculoza, febra tifoidă, etc.) în declanşarea căreia factorii de patogenitate bacterieni au rol esenţial.

Bacteriile patogene oportuniste prezente în organism, în mod obişnuit nu produc boală; ele provin din flora comensală sau saprofită. Aceste bacterii îşi exprimă puterea patogenă dacă sistemul de apărare al gazdei este deficitar.

Unele grupe de microorganisme pot cauza boala în urma ingestiei de substanţe (toxine) produse prin creşterea bacteriei în produsele alimentare (ex. *Clostridium botulinum*, botulism; *Bacillus cereus*, vomismente).

Pentru ca infecţia să evolueze, numărul microorganismelor patogene trebiue să crească într-un ritm mai rapid decât ritmul gazdei de eliminare sau omorâre a bacteriilor.

Numărul iniţial mare de bacterii patogene creşte şansa colonizării. Numărul minim de bacterii infectante necesar pentru a determina infecţia se numeşte *număr infectiv minim* (NIM). Acest număr variază pentru diversele specii patogene şi este influenţat de starea generală de sănătate şi de statusul imun al gazdei.

Creşterea şi fixarea microorganismului la poarta de intrare necesită în mod obişnuit formarea unui microfilm (biofilm). Biofilmele şi microcoloniile sunt aglomerări ale microorganismelor care se fixează pe suprafaţă şi se acoperă cu un exopolimer (glicocalix) compus din polizaharide, glicoproteine şi/sau proteine.

Creşterea în interiorul glicocalixului protejează patogenul de acţiunea fagocitelor, modulează micromediul său şi reduce eficienţa multor antibiotice. Densitatea mare a bacteriilor în biofilm iniţiază producerea unor factori extracelulari de virulenţă, cum ar fi toxine, proteaze siderofori (liganţi cu molecula mică responsabili pentru solubilitatea şi transportul fierului în celula microbiană).

Virusurile sunt incapabile să se multiplice extracelular şi trebuie să ajungă rapid în celule. În celulele gazdei neimunizate se multiplică. După etapa de consolidare, patogenul se poate răspândi în ţesuturile învecinate şi/sau, pe cale sanguină, determină focare secundare de infecţie.

În final, microorganismul părăseşte gazda supravieţuieşte şi/sau pătrunde imediat într-o gazdă sensibilă.

Porţile de intrare

Tegumentul şi mucoasele

Tegumentul este cel mai expus microorganismelor; primul contact între gazdă şi parazit are loc la nivelul suprafeţei cutanate sau mucoase în stare intactă, când pătrunderea acestora nu este permisă.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Pentru a preveni iniţierea procesului infecţios în timpul acestui contact gazda a dezvoltat mecanisme defensive, dintre care multe nu sunt direcţionate specific spre anumite specii. Barierele mecanice (stratul keratinizat, secreţiile glandelor) tind să prevină infectarea cu un potenţial agent patogen.

Suprafaţa sa conţine puţine surse nutritive şi pH-ul acid nu este favorabil creşterii microbiene. Majoritatea microorganismelor mor pe suprafaţa pielii. Comensalii sunt bine adaptaţi la creşterea pe tegument şi previn instalarea unor contaminanţi. Infecţiile tegumentului apar rar ca leziuni, dacă microorganismul străbate epiderma (*Trichophyton mentagrophytes*).

Infecţiile apar în urma lezării tegumentului (arsuri, tăieturi, înţepături ale insectelor şi animalelor, injecţii cu instrumentar contaminat).

Utilizarea intensivă a instrumentaţiilor intravasculare şi extravsculare şi a implantelor, a dus la creşterea infecţiilor nosocomiale cu comensali cum ar fi *Staphylococcus epidermidis*. Bacteria creşte sub formă de biofilm, pe suprafaţa dispozitivului şi contaminarea acestuia are loc pe parcursul implantării. Din biofilm bacteriile trec în sânge şi determină bacteriemii. Acestea răspund rapid la tratament, dar biofilmul, care este recalcitrant la terapia cu antibiotice, rămâne şi acţionează ca o sursă continuă de infecţie.

Membranele mucoase oferă un mediu mult mai favorabil decât tegumentul pentru creşterea bacteriilor: umiditate, temperatură, nutrienţi. Totuşi mucoasele posedă anumite caracteristici care le fac rezistente la infecţii. Majoritatea au flora proprie comensală, bine adaptată, care nu poate fi înlocuită de microorganismele invădante. Mucoasele sunt protejate şi de bariere fizico-chimice cum ar fi pH-ul foarte acid în stomac, prezenţa anticorpilor nespecifici care circulă liber, a macrofagelor şi fagocitelor. Toate infecţiile încep prin contactul dintre aceste ţesuturi şi patogenul potential.

Contactul poate fi direct sau indirect, prin vectori neanimaţi: particule de sol, alimente, lichide, particule din aer care pot fi inhalate sau pătrund în leziuni.

Tractusul respirator

Numărul de particule organice suspendate în aer este foarte mare; într-un spaţiu închis pot fi până la 1000 microorganisme/ mm^3 . Majoritatea acestor microorganisme din aer sunt bacterii nepatogene şi fungi pe care o persoană le inhalează în număr de aproximativ 10 000/zi. Tractusul respirator este protejat de stratul mucociliar care acoperă cavitatea nazală şi căile aeriene inferioare. Particulele sunt reţinute de mucus şi transportate sub acţiunea cililor spre partea posterioară a faringelui de unde sunt înghiţite.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Regiunea alveolară este protejată de macrofage. Pentru a rezista, patogenul trebuie să evite capcana reprezentată de mucus şi înghiţit, iar dacă a ajuns în sacul alveolar trebuie să evite înglobarea în macrofage sau să reziste digestiei acestora.

Prezenţa adezinelor, specifice pentru receptorii epiteliali, asigură fixarea microorganismului şi astfel este evitată îndepărtarea sub acţiunea stratului mucociliar.

Tractusul intestinal

Tractusul intestinal este structurat în scopul preluării şi prelucrării alimentelor, absorbţiei nutrienţilor în mediul intern, evacuării resturilor alimentare neresorbite, la care se adaugă funcţii ale excreţiei hepatice.

Intestinul gros este foarte populat cu microorganisme comensale, adesea asociate cu peretele intestinal, încorporate în stratul de mucus protector sau fixate direct pe celule epiteliale. Patogenitatea bacteriilor şi virusurilor depinde de abilitatea acestora de a trece de bariera reprezentată de stomac (conţinutul acid) şi duoden (bila cu efecte antimicrobiene) şi capacitatea lor de a se ataşa pe intestin şi a-l străbate în competiţie cu flora comensală şi în pofida prezenţei anticorpilor secretorii.

Secreţiile digestive, masticaţia, deglutiţia, peristaltismul intestinal, favorizează eliminarea microorganismelor.

Prin sistemul complex de bariere antimicrobiene patogenii nu pot trece decât prin puncte de minimă rezistenţă naturală (celulele M de la nivelul plăcilor Peyer, care captează antigenele) sau dacă posedă echipamente speciale de patogenitate. Microorganismele invadante percep schimbările mediului şi se adaptează prin mecanisme de reglare complexe care declanşează factorii de virulenţă ce favorizează invadarea şi supravieţuirea în interiorul gazdei. De exemplu speciile de *Yersinia, Shigella* produc factori de virulenţă ca răspuns la temperatura de 37^0C, temperatură probabilă în momentul infecţiei.

Tractusul urogenital

Vezica, ureterele şi uretra sunt sterile la persoanele sănătoase şi urina sterilă parcurge constant tractusul urinar. Microorganismele, care invadează tractusul urinar trebuie să se menţină la suprafaţa epiteliului şi să evite eliminarea prin spălare în cursul micţiunii.

La bărbat uretra este lungă (cca 20 cm) şi bacteriile pot fi introduse direct în vezică prin cateterisme vezicale.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Uretra femeii este mult mai scurtă (cca 5 cm) şi poate fi traversată mai uşor de microorganismele normal rezidente la nivelul vulvei şi uretrei distale. De aceea infecţiile urinare predomină la femei. Răspândirea infecţiei de la vezică la rinichi se realizează uşor prin refluxul urinii spre ureter. Instrumentaţiile care lezează bariera tegumentară, cateterismele prelungite ale vezicii, favorizează bacteriuriile (prezenţa bacteriilor în urină) cu diferite complicaţii.

În microbiota vaginului predomină bacilii Gram-pozitivi anaerobi (lactobacilii) care prin fermentarea glicogenului creează un pH acid.

Acest pH, concentraţia crescută în uree a urinei, fluxul urinar în sens unic, inhibă colonizarea cu alte bacterii, exceptând lacto-bacilii care fac parte din flora comensală.

Vezica urinară nu are posibilităţi deosebite de eliminare a contaminanţilor accidentali; fagocitoza este absentă la nivelul mucoasei vezicale iar în urina restantă între micţiuni se multiplică alte tipuri de bacterii care nu pot coloniza vaginul decât dacă sunt foarte specializate (bacterii asociate cu bolile venerice).

Bacilii Gram negativi sunt cei mai frecvent implicaţi în infecţiile tractusului urinar. *Escherichia coli* determină aproximativ 80% din infecţiile acute la pacienţii fără catetere, anomalii urologice sau calculi. Cocii Gram pozitivi au rol mai mic în infecţiile urinare. Izolarea din urină a speciei *Staphylococcus aureus* ridică suspiciunea de infecţie bacteriană a rinichiului.

Conjunctiva

În mod obişnuit conjunctiva este lipsită de microorganisme şi protejată de secreţia lacrimală şi a altor glande, dar şi prin spălarea mecanică a suprafeţei prin mişcarea pleoapelor în timpul clipitului.

Lezarea conjunctivei, prin acţiuni mecanice sau reducerea secreţiilor, favorizează creşterea adeziunii microbiene şi colonizarea cu patogeni oportunişti.

Infecţia este favorizată de utilizarea lentilelor de contact, expunerea la agenţi chimici sau traumatizarea şi infecţia marginii pleoapelor (blefarite).

Consolidarea

Pentru a rezista patogenul trebuie să supravieţuiască la poarta de intrare unde, frecvent, intră în competiţie cu flora comensală şi trebuie să se sustragă acţiunii macrofagelor şi leucocitelor. Aceasta impune ataşarea puternică a microorganismului de suprafaţa epiteliului. Fixarea trebuie să fie specifică şi este mediată de prezenţa pe suprafaţa celulei bacteriene a substantelor adezive, cum ar fi mucopeptidele şi mucopolizaharidele din stratul de slim, fimbrii, pili şi aglutinine.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Consecința contactului dintre țesut și patogen este dominată de abilitatea microorganismelor de a se multiplica într-un număr mai mare decât poate fi eliminat din țesut, iar factorii care influențează acest aspect sunt: rata de creștere, numărul inițial de microorganisme prezente la locul infecției, abilitatea de a învinge efortul gazdei de a le omorâ.

Rezistența la apărarea gazdei

Multe bacterii nu depășesc bariera țesutului epitelial (*Bordetella pertusis, Corynebacterium diphteriae, Vibrio cholera*e) deoarece nu pot lupta cu mecanismele de apărare ale gazdei. Supraviețuirea lor este asigurată prin fixarea puternică de celulele epiteliate; infecția se manifestă prin toxinele bacteriate eliberate.

Alte microorganisme, care produc infecții sistemice, (*Salmonella typhi, Streptococcus pyogenes*) după ce au traversat bariera epitelială, au capacitatea de a pătrunde în celulele sensibile care le protejează de factorii de apărare ai gazdei, sau, după ce au fost fagocitate de macrofage sau polimorfe, rezistă la acțiunea fagocitară, multiplicându-se în acestea (ex. *Mycobacterium tuberculosis* la care cerurile din peretele celular au rol protector).

În rezistența la fagocitoză un rol major are capsula bacteriană, care este asociată cu o mare capacitate de multiplicare extracelulară și diseminare hematogenă.

Modularea răspunsului inflamator

Microorganismele eliberează în medii numeroși produși celulari care produc o inflamație non-specifică asociată cu dilatarea vaselor sanguine. Capilarele se dilată și înlesnesc accesul fagocitelor spre locul infectat.

Creșterea torentului limfatic de la țesutul inflamat antrenează bacteriile spre nodulii limfatici unde intră în acțiune forțele antimicrobiene și imune.

Unele din substanțele eliberate de microorganisme sunt chemotactice pentru polimorfe care au tendința de a se concentra la locul infecției.

Numeroase microorganisme au mecanisme adaptate să la protejeze contra sistemelor de apărare ale gazdei. Astfel, *Staphylococcus aureus* poate suprima, prin intermediul peptidoglicanului, inflamația inițială și mai posedă un alt factor care suprimă chemotaxia polimorfonuclearelor.

Rezistența la fagocitoză

Moartea care urmează fagocitozei poate fi evitată dacă microorganismele sunt protejate de procesele intracelulare: omorâre și digestie. Bacteriile supraviețuiesc în interiorul fagocitelor fie

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prin liza vacuolei fagocitare sau prin absența fuziunii cu lisosomii (*Listeria monocytogenes*), fie prin rezistența la atacul enzimelor din fagocite (*Mycobacterium tuberculosis*) la care peretele, care conține ceruri, are rol protector.

Alte microorganisme produc o catalază extracelulară (ex. stafilococul) care neutralizează peroxidul de hidrogen eliberat în vacuole.

Omorârea fagocitelor este o altă strategie a microorganismelor. Producerea de leucocidine (stafilococi, streptococi) inițiază eliberarea substanțelor lisosomale în citoplasma fagocitului în loc ca aceasta să se acumuleze în vacuolă; astfel celula se autodistruge.

Patogenitatea microorganismelor

Un microorganism își manifestă patogenitatea dacă realizează o serie de condiții: pătrunde și persistă în organismul gazdă prin depășirea sau neutralizarea barierelor și mecanismelor antimicrobiene; se multiplică și invadează organismul gazdă sau eliberează toxine; lezează structurile gazdei.

Virulența bacteriană exprimă gradul de patogenitate și se măsoară prin doze letale minime; (numărul minim de microorganisme care omoară toate animalele inoculate, DLM).

Bolile bacteriene sunt rezultatul conflictului dintre bacteria patogenă și gazdă (sau terenul receptiv); microorganismul tinde să invadeze țesuturile iar organismul reacționează pentru a-l elimina sau distruge.

Puterea patologică a unei bacterii depinde de două grupe de factori:

- factori care asigură multiplicarea bacteriei în interiorul organsimului (factori de invazivitate);
- factori legați de producerea de toxine (toxigeneza).

Patogenitatea și invazivitatea

Invazia de către bacterie a organismului trece prin trei etape:

- colonizarea tegumentului și mucoaselor;
- invadarea mucoaselor;
- diseminarea în organism.

Colonizarea mucoaselor

Capacitatea bacteriilor de aderare la celulele mucoase le conferă o mai bună rezistență la mecanismele de apărare ale gazdei (ex. infecțiile urinare: bacteriile aderente la mucoasa urinară sunt

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mai greu eliminate prin fluxul urinar; infecţiile tractusului respirator: adeziunea compromite eficienţa transportorului mucociliar şi amplifică eficienţa acţiunii toxinelor şi enzimelor bacteriene difuzibile: ex. enterotoxinele produse de *Escherichia coli* enterotoxigen).

Adeziunea bacteriană se poate exercita şi la suprafaţa biomaterialelor (catetere, proteze cardiace şi osoase) care implantate în organism, cauzează infecţii, mai ales cronice.

Diferite structuri de suprafaţă ale bacteriei sunt suportul proprietăţii de adeziune; pili, fimbrii, glicocalix, slim. Bacteriile fixate se multiplică şi în anumite cazuri formează un biofilm în care bacteriile sunt protejate.

Patogenii non-invazivi se rezumă doar la colonizarea zonei mucoase corespunzătoare.

Bordetella pertusis, care produce tusea convulsivă, este inhalată şi localizată rapid în pătura mucociliară a tractusului respirator. Toxina produsă de bacterie inhibă mişcarea cililor la suprafaţa epiteliului care ar putea elimina microorganismul. Inflamaţia şi necroza este produsă de o toxină cu difuziune limitată, care ajunge în ţesutul subepitelial.

În intestin numeroşi patogeni aderă la mucoasa intestinală şi eliberează toxine care trec prin perete în circulaţia generală. *Vibrio cholerae* şi *Escherichia coli*, localizate pe mucoasă, produc toxine care cresc permeabilitatea vasculară. Are loc o hipersecreţie a fluidelor isotonice în lumenul intestinal, diaree acută şi ca urmare deshidratarea care poate fi fatală pentru copii şi bătrâni.

Pentru a infecta cu succes gazda, unii agenti au tropism pentru regiuni specifice ale corpului sau pentru tipuri speciale de celule: *Helicobacter pylori* produce urează, care scindează ureea cu formare de ioni de amoniu şi face posibilă existenţa bacteriei într-un mediu neutru în interiorul epiteliului gastric, care are aciditate crescută.

Invazia mucoaselor

Numeroase bacterii şi majoritatea virusurilor au capacitatea de a se ataşa de mucoasa epitelială şi de a trece rapid în celulele epiteliale.

Aceste microrganisme – patogeni parţial invazivi – se multiplică rapid în mediul protector al celulei gazdă, eventual o omoară şi induc boala prin eroziunea sau ulcerarea mucoasei epiteliale.

Fenomenul este prezent la *Enterobacteriaceae: Shigella, Escherichia coli, Salmonella, Yersinia,* care pot provoca propria fagocitoză de către celulele epiteliale ale mucoasei intestinale. Ajunse în citoplasmă: a). se multiplică în celula gazdă care sfârşeşte prin a muri şi procesul trece de la o celulă la alta, fără a ajunge şi la regiunile submucoase sau; b). traversează simplu celulele epiteliale, apoi sunt preluate de fagocite unde supravieţuiesc şi merg să colonizeze ganglionii mesenterici.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diseminarea în organism

Patogenii invazivi trec în țesuturile din vecinătatea focarului primar al infecției sau sunt transportați pasiv de sânge, limfă, lichid cerebrospinal, fluide pleurale. Numeroase bacterii agresive, determină focare secundare de infecție în diferite organe.

Răspândirea activă a microorganismelor prin țesuturile subepiteliale normale este dificilă deoarece materialul celulei este un gel care inhibă mișcarea bacteriilor. Moartea sau liza celulelor țesutului, produce un lichid foarte vâscos, rezultat parțial din denaturarea ADN. Traumele fizice, cum ar fi rănile sunt rapid acoperite cu cheaguri de fibrină care limitează căile de răspândire a patogenilor oportunişti.

Producerea de toxine şi enzime

Lezarea țesuturilor se poate produce direct, prin toxine (bacteriotoxine, micotoxine).

Bacteriile cum ar fi *Streptococcus pyogenes, Clostridium perfrigens,* stafilococi pot ajunge în țesuturi datorită abilității de a produce diferite enzime extracelulare şi intracelulare.

Toxinele bacteriene se diferențiază, după structura chimică şi proprietățile biologice în *toxine proteice* (exotoxine), produse mai ales de bacteriile Gram-pozitive şi *toxinele lipopolizaharidice* (endotoxine Gram-negative, formate din lipidul A şi miezul polizaharidic).

Toxinele proteice sunt cele mai puternice otrăvuri cunoscute, termostabile şi acționează intracelular, asupra unor ținte moleculare sau produc liza celulelor eucariote.

Toxinele lipopolizaharidice sunt eliberate numai după liza celulei bacteriene. Sunt termostabile şi alcoolostabile. Fracțiunea lipidică (lipidul A) este suportul principalelor proprietăți toxice:

- efectul leucopeniant – în doză mică, 60% din leucocite dispar, după care urmează o hiperleucocitoză reactională;
- efectul pirogen indirect, urmarea acțiunii leucopeniante când se eliberează substanțe pirogene provenite din leucocitele distruse;
- efectul toxic, manifestat prin hipotensiune, diminuarea circulației, mergând până la şoc endotoxinic şi moarte.

Şocul endotoxinic se instalează şi prin perfuzarea unor soluții contaminate cu bacili Gram-negativi.

Dozele mici de endotoxină, inoculate prin medicamente insuficient depirogenate, determină febră.

Micotoxinele sunt produse de mucegaiuri.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aflatoxinele au ca țintă de acțiune acizii nucleici (efecte cancerigene, inhibarea sintezei ARNm, deci a sintezei proteice).

Anumite bacterii elaborează substanțe care nu sunt toxine ci enzime care prin activitatea lor ocupă un loc important în derularea procesului infecțios.

Hemolizinele, produse de stafilococii patogeni şi streptococi, au acțiune litică asupra hematiilor, eliberând nutrienții care conțin fier.

Fibrinolizinele, produse de stafilococii (stafilokinaze) şi streptococi (streptokinaze) dizolvă cheagurile de fibrină formate în jurul leziunilor şi favorizează răspândirea microorganismelor.

Colagenazele şi hialuronidazele, produse de numeroase bacterii invazive agresive, dizoplvă fibrele de colagen şi acizii hialuronici care funcționează ca un ciment intercelular.

Streptolizinele O şi S produse de *Streptococcus pyogenes* rup membranele leucocitelor diminuând apărarea gazdei.

Fosfolipazele (α - toxina produsă de *Clostridium perfrigens*) distrug celulele țesuturilor prin hidroliza fosfolipidelor prezente în membranele celulei.

Amilazele, peptidazele şi dezoxiribonucleazele imobilizează numeroşi nutrienți care sunt eliberați din celula lizată. De asemenea reduc vâscozitatea fluidului prezent în leziune.

Coagulaza produsă de *Staphylococcus aureus* are proprietatea de a coagula în câteva ore plasma umană sau de iepure, citratată, heparinată sau oxalată. Coagulaza acționează ca o substanță similară protrombinei, "înglobează" cocii într-o masă de fibrină şi-i protejează de fagocitoză.

Beta-lactamazele sunt enzime produse de numeroase specii bacteriene care hidrolizează nucleul beta-lactamic al antibioticelor beta-lactamice.

Lezarea indirectă a țesuturilor

Produşii inflamatori sunt eliberați din celulele necrotice sau direct de bacteria infectantă.

Inflamația determină tumefierea, durerea, înroşirea şi uneori modificarea funcției organului afectat. Aceste reacții sunt adesea semnele majore şi simptomele infecției.

Numeroase microorganisme mimează efectul sistemului de apărare al gazdei împotriva lui prin mimarea structurii antigenice a țesutului gazdei.

Eventualul răspuns imunologic al gazdei față de infecție duce la autodistrugerea imună. Astfel, infecția cu *Mycoplasma pneumoniae* poate determina producerea de anticorpi antieritrocite Grup 0 normale cu o anemie hemolitică concomitentă.

Dacă antigenul eliberat de agentul infecțios este solubil, se obține un complex antigen-anticorp.

Când anticorpii sunt prezenți în concentrație egală sau mai mare decât concentrația antigenului, ca în cazul gazdei imune, complexele precipită și sunt îndepărtate de macrofagele prezente în nodulii limfatici. Dacă antigenul este prezent în exces, complexele continuă să circule în sânge și eventual sunt reținute la nivelul rinichiului, în glomeruli. Sistemul complement inițiază astfel un răspuns inflamator localizat.

Este posibil ca funcția de filtrare a rinichiului să fie alterată și apar simptome de glomerulonefrită cronică.

Revenirea la starea de sănătate. Eliminarea microorganismului

În general, recăpătarea stării de sănătate este asociată cu distrugerea completă a bacteriei și restaurarea condiției de sterilitate a țesuturilor. Alternativ, bacteria poate reveni la relația de comensalism cu gazda pe tegument sau epitelii.

Când microorganismul infectant este un patogen obligat, condiția ca acesta să supraviețuiască este infectarea altui organism, inainte de a fi eradicat de gazdă. Calea de ieșire este comună cu poarta de intrare. Patogenii din tractusul digestiv sunt eliberați în fecale și pot contamina ușor apa și alimentele. Agenții infecțioși ai tractusului respirator, eliberați prin tuse, strănut, în timpul conversației supraviețuiesc în picăturile de apă cu care sunt asociați și infectează indivizii din apropiere. Microorgansmele transmise prin vectorii animali sau insecte sunt răspândiți pe aceeași cale. Pentru microorganisme fragile (*Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum*), transmiterea se face prin contactul direct între epitelii. Dar rezervorul constant pentru infecție este reprezentat de habitatul natural al microorganismelor.

Epidemiologia bolilor infecțioase

Propagarea bolilor infecțioase într-o populație se poate face vertical (transfer de la o generație la alta) și orizontal (transfer între grupepe neînrudite genetic).

Infecțiile inaparente pot cauza epidemii, plecând de la indivizi cu toate semnele biologice, inclusiv eliminarea în mediu a agentului patogen. În urma unei infecții aparente sau inaparente, omul și animalele pot deveni rezervoare microbiene atât pentru infecțiile închise cât și pentru cele deschise.

Infecțiile deschise. Agentul infecțios este eliminat în mediul exterior și poate fi transmis cu ușurință celor din jur. În cazul virusurilor, acestea pot fi eliminate înaintea apariției simptomelor clinice.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Eliminarea poate dura perioade lungi de timp, uneori chiar toată viața.

Propagarea se poate face direct, (picăturile de salivă) prin mâinile murdare, prin contact direct (bolile venerice) sau indirect – agentul infecțios eliminat de bolnav poate persista în mediu timp îndelungat.

Infecțiile închise. Bacteria este, pentru un anumit timp, prezentă în sânge, dar în nici un moment nu apare în mediu. Agentul infectant trebuie prelevat de la bolnav prin intermediul unei gazde vector (artropode) şi inoculat unui individ sănătos.

Difuzarea bolilor infecțioase

Infecția poate apare la cazuri izolate, separate în timp: este *forma sporadică*. Dar poate apare concomitent la mai mulți indivizi - *forma epidemică.*

Anumite infecții au provocat odinioară epidemii care au decimat un număr enorm de persoane (ex. epidemiile de pestă).

Un alt aspect al infecțiilor transmisibile este caracterul *endemic*: boala persistă în mod permanent, într-o țară sau regiune, cazurile sunt mai mult sau mai puțin numeroase, dar boala nu se răspândeşte. Astfel, tifosul, are un statut permanent în Africa de Nord, Asia Centrală.

Anumite boli infecțioase sunt specifice omului – *antroponoze* (gonococia, sifilisul), iar altele sunt strict animale – *zoonoze*. Sunt şi boli care se transmit între om şi animal – *antropozoonoze.*

Rezervorul bacterian este reprezentat în mod curent de animalele domestice. Contaminarea se face direct prin muşcături, zgârieturi, excoriații, sau indirect prin urină, materii fecale, produse lactate ingerate.

Purtătorul sănătos de germeni (purtătorul inaparent) este o verigă importantă în lanțul epidemiologiei bolilor transmisibile. Un individ poate deveni purtător de germeni, după o boală infecțioasă clasică (difterie, febră tifoidă), după o infecție inaparentă, după ingerarea de alimente şi apă contaminate, după contactul cu un individ aparent sănătos, dar purtător.

În rinofaringele multor subiecți se găsesc stafilococi, streptococi inofensivi pentru purtător, dar agresivi pentru cei predispuşi, copii mai ales.

Portajul poate fi efemer sau se extinde pe durată mai mare de timp (săptămâni, luni). Portajul se poate instala definitiv – animale rezervoare de germeni (ex. în leptospiroze leptospirele sunt eliminate în mod constant de şobolani şi rozătoare de câmp, prin urină).

Germenul nu este patogen pentru purtător pentru că acesta a fost imunizat în urma unei boli complete sau a infecției inaparente. Purtătorul sănătos de germeni poate contamina anturajul şi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

provoca o epidemie printre subiecţii receptivi.

Sunt numeroşi factori care contribuie la apariţia, propagarea şi persistenţa bolii infecţioase: mizeria, malnutriţia, războaiele, deplasările grupurilor de indivizi, poluarea aerului şi a apei.

Bibliografie

Madoff LC, Kasper DL. *Introducere la bolile infecţioase: interacţiunea gazdă-parazit.* In: Principiile Medicinei Interne, ed. Harrison, Ed. Teora, Bucureşti, V1, 535-539, 1998.

Kasper DL. *Introduction to bacterial diseases*. In: Principles and Practice of Infections Diseases, 3d ed. GL Mandell et al (eds), New York, Wiley, 1484-1489, 1990.

Zarnea G. *Tratat de Microbiologie Generală*. Ed. Academiei Române, V5, 451-541, 1994.

Dirita VJ, Mekalanoss JJ. *Genetic regulation of Bacterial virulence*. Annu Rev Genet 23:455, 1989.

Pier GB. *Mecanisme moleculare ale patogenezei bacteriene*. In: Princiliipe Madicinei Interne, ed. Harrison, Ed. Teora, Bucureşti, V1, 654-658, 1998.

Mekalanoss JJ. *Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria.* J Bacteriol 174: 1, 1992.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9

Mecanisme de apărare ale organismului gazdă
Noțiuni de imunologie

În unele scrieri s-a consemnat că o persoană care a contractat o anumită boală infecțioasă nu mai este sensibilă la un nou atac, nu mai dezvoltă infecția (a devenit imun).

Au fost făcute numeroase încercări de a induce starea de imunitate. În China şi India, în timpuri străvechi se practica inocularea organismelor cu virusul variolei obținut din pustulele infectate ale bolnavilor. Eficiența operațiunii era variabilă şi adesea dependentă de îndemânarea celui care o practica. Rezultatele erau uneori dezastruoase pentru cel supus inoculării.

Părintele imunologiei este considerat Edward Jenner (1749-1823), un medic englez de țară, care a observat o asemănare între pustulele date de virusul variolei şi variola bovinelor, o boală care afecta ugerul vacilor. A mai constatat că mulgătorii care contractaseră virusul bovin, prin contactul cu ugerul infectat, deveniseră imuni la variolă. După inocularea deliberată a unui animal tânăr cu virusul variolei bovine şi apoi, după ce animalul s-a vindecat , reinocularea cu conținutul unei pustule obținut de la un individ cu variolă, a observat că boala nu se mai produce. Procesul de vaccinare (latină, vacca, vacă) a fost adoptat ca o măsură preventivă împotriva virusului variolei, deşi mecanismul prin care se obținuse imunitatea nu fusese descifrat.

În 1801, Jenner anticipează eradicarea variolei prin vaccinare. În 1967 boala afectase 10 milioane de oameni. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a inițiat un program de vaccinare în scopul eradicării bolii. Ultimul caz a fost semnalat în 1977 în Somalia, iar în 1979 OMS, confirmând profeția lui Jenner, anunță eradicarea variolei.

Imunologia studiază atât răspunsul imun al organismului la acțiunea virusurilor şi bacteriilor, cât şi recunoaşterea tumorilor şi rejecția transplantului de organe şi țesuturi, eliminarea paraziților din organism, autoimunitatea (condiția în care organismul reacționează asupra propriilor țesuturi).

Definiții

Boala infecțioasă este rezultatul interacțiunii dintre organismul animal şi uman şi microorganisme: bacterii, rickettsii, virusuri.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un microorganism *patogen* are abilitatea de a produce infecția. *Virulența* indică gradul de patogenitate a microorganismului. Diminuarea virulenței normale a patogenului se numește *atenuare*; uneori virulența este pierdută complet și microorganismul se numește *avirulent*. Invers, creșterea virulenței se numește *exaltare*.

Organismul are mecanisme naturale de apărare care mențin microrganismul în limite pe care le poate tolera. Perturbarea acestui mecanism, prin lezarea țesuturilor care normal sunt inaccesibile, determină infecția.

Mecanismele de apărare antimicrobiană sunt numeroase, diverse, complexe: acestea sunt reprezentate prin elementele non speficice celulare și umorale, care intervin indiferent de microorganismele în cauză și prin elementele specifice care au capacitatea de a recunoaște patogenul.

Mecanismele non specifice de apărare (imunitatea naturală)

Organismul posedă o serie de sisteme non specifice care-l fac rezistent la agresiunea bacteriană. Imunitatea naturală este prezentă înaintea contactului cu agentul patogen.

Barierele cutanate și mucoase

În stare intactă, tegumentul și mucoasele actionează ca bariere fizice, chimice și biologice contra invaziei microorganismelor.

Bariera fizică:

- Tegumentul intact nu este penetrat de bacterii; keratinizarea și descuamarea superficială contribuie la eliminarea unui număr mare de microorganisme.
- Mucoasele, mai ușor de străbătut ca tegumentul, sunt puncte de plecare pentru majoritatea infecțiilor spontane, dar prezența unor dispozitive le conferă rezistență la infecții: aparatul mucociliar de pe mucoasa respiratorie, mișcările proprii (fluxul urinar, peristaltismul intestinal) dirijează bacteriile spre exterior.

Bariera chimică reprezentată de producerea locală de metaboliți care diminuează sau împiedică multiplicarea bacteriilor:

- pH-ul local acid (gastric, vaginal, al urinei);
- prezența lisozimului în secreții (lacrimale, nazale, salivare, intestinale) care scindează peptidoglicanul peretelui bacteriilor Gram-pozitive;

BCU MSU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bariera biologică: prezența florei comensale pe tegument şi mucoase, împiedică multiplicarea bacteriilor patogene (antibioză), fie prin competiție nutritivă, fie prin producerea de substanțe (bacteriocine) care inhibă creşterea potențialilor patogeni.

Reacția inflamatorie

Un simptom care apare imediat după ce o bacterie sau toxinele acesteia au pătruns în țesut este *inflamația*.

Reacția inflamatorie începe cu dilatarea arteriolelor şi capilarelor locale, cu creşterea fluxului sanguin în zonă şi apariția unei hipertermii locale caracteristice.

Permeabilitatea capilară şi exudarea de factori plasmatici cresc: complementul, transferina şi lactoferina (chelatori de fier care afectează metabolismul bacterian), fibrinogenul care formează un precipitat de fibrină ce limitează focarul infecțios. Reacția inflamatorie este totodată şi o reacție celulară: fagocitele din sânge migrează spre focarul infecțios atrase de substanțe chimiotactice prezente acolo; acestea sunt produse fie de gazdă (complementul) fie de bacterie (lipopolizaharide, polipeptide). Edemul inițial poate favoriza creşterea bacteriană.

Inflamația este o reacție non specifică: creşterea temperaturii regiunii afectate, vasodilatarea, edemul, durerea, apar indiferent dacă agresorul este un microorganism, o toxină sau o acțiune fizică sau chimică.

Cea mai frecventă manifestare a inflamației este febra. Centrul termoreglator din hipotalamus poate fi afectat de endotoxinele bacteriilor Gram-negative, de monokine secretate de monocite şi macrofage (pirogenii endogeni). Temperatura ridicată stimulează producerea de anticorpi şi proliferarea celulelor T, acestea fiind efectele benefice ale febrei.

Fagocitoza

Fenomenul cel mai caracteristic la nivelul focarului infecțios este fagocitoza (ingestia celulară) realizată de fagocite (polimorfonucleare şi monocite).

Rolul fagocitelor în înglobarea şi digestia microorganismelor a fost lămurit de Mecinikov (1883), care elaborează teoria fagocitară a imunității.

În sânge sunt prezente ambele tipuri de fagocite care se formează la nivelul măduvei osoase.

Monocitele reprezintă aproximativ 5% din numărul total al leucocitelor. Acestea sunt prezente în sânge (monocite) şi în țesuturi, ca celule fixe sau migratoare, numite *macrofage*. Macrofagele sunt celule mari, cu durată mare de viață, prezente în numeroase organe şi în seroasele cavităților şi ale plămânului. Monocitele trec după 2-3 zile din torentul sanguin în splină, ganglioni

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

limfatici, creier. Macrofagele tisulare alcătuiesc sistemul reticuloendotelial din măduva osoasă, ficat, splină, ganglionii limfatici, suprarenale, plămân, peritoneu.

Polimorfonuclearele sunt prezente în sânge, țesuturi, măduva osoasă. După afinitățile tinctoriale ale granulațiilor citoplasmatice se grupează în polimorfonucleare neutrofile şi eozinofile.

Polimorfonuclearele neutrofile (PMN) se formează şi se maturizează în măduva osoasă de unde trec în sânge. Nu se divid şi în sânge au o viață scurtă, de 6-8 ore. Reprezintă peste 70% din totalul leucocitelor. Mobilitatea este asigurată de capacitatea de a emite pseudopode, migrarea fiind direcționată de chimiotactism. Citoplasma conține granulații bogate în enzime hidrolitice care asigură digestia particulelor înglobate.

Fagocitoza are multe etape succesive:

- Migrarea fagocitelor spre focarul infecțios, prin recepționarea semnalelor chemotactice. PMN, deoarece au mobilitate mai mare decât monocitele, ajung primele la locul infecției;
- Ataşarea bacteriilor de membrana fagocitelor. Unele microorganisme nu aderă la fagocite datorită încărcării negative (ca a fagocitelor) şi capacitatea lor de aderare este mărită prin *opsonizare*. *Opsoninele* sunt factori serici nespecifici (fracțiunea *C3b* a complementului) sau specifici (anticorpi) care fixați pe suprafața bacteriilor le modifică încărcarea electrică.
- Îngestia. Pseudopodele emise de fagocite înconjoară microorganismul şi îl înglobează într-o vacuolă (fagosom). Granulele lisosomale dispar prin fuzionarea cu membrana fagosomului. Enzimele lisosomale distrug microorganismul fagocitat. Degranularea este precedată de stimularea metabolismului oxigenului (explozia respiratorie) din care rezultă peroxidul de hidrogen (H_2O_2). Acumularea acestuia permite fixarea halogenilor pe membrana bacteriană cu efect letal pentru microorganism. De asemenea are loc activarea glicolizei, din care rezultă energia necesară activității fagocitelor dar şi aciditatea mediului (pH ≈ 4). PH-ul acid, optim pentru activitatea enzimelor lisosomale este incompatibil cu supraviețuirea bacteriilor.

Bacteriile patogene au diferite mijloace de a împiedica fagocitoza: stafilococii şi streptococii produc exotoxine (leucocidine) nocive pentru fagocite; prezența capsulei la unele specii (*Bacillus anthracis*) împiedică fagocitoza.

Bacteriile nedistruse la nivelul focarului infecțios trec pe cale limfatică în ganglioni şi prin torentul sanguin, în alte organe; pe acest parcurs sunt supuse acțiunii monocitelor, cu o activitate fagocitară intensă. Sub acțiunea monocitelor microbii sunt eliminați din torentul sanguin şi omorâți.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fagocitele reprezintă o barieră de apărare excelentă. Activitatea fagocitară este amplificată de complement, un complex de substanțe proteice.

Sistemul complement. Interferoni

Complementul reprezintă un grup de proteine serice termolabile care activate, au acțiune bactericidă. Este constituit din 9 fracțiuni (*C1 – C9*) dar unele din acestea posedă subfracțiuni (ex. fracțiunea *C3* are subfracțiunile *C3a* şi *C3b*) la sinteza cărora participă macrofagele, ficatul, splina, epiteliul intestinal. Sistemul complement intră în acțiune numai după activarea într-o cascadă de reacții enzimatice.

Interferonii. Sunt glicoproteine cu rol important în apărarea antivirală. Aceştia au acțiune indirectă antivirală: se fixează pe membrana celulei şi induc sinteza unor proteine secundare. Dacă celulele tratate cu interferon sunt infectate cu virus, interferonul inhibă acidul nucleic viral şi sinteza proteinelor iar infecția este oprită.

Interferonii se produc mai rapid decât anticorpii şi acțiunea asupra unui număr mare de virusuri este probabil determinată de titrul inițial al interferonului şi virusului, protecția fiind mai eficientă când doza infectantă de virus este mică.

Potențial, interferonul este un agent antiviral ideal, care nu are efect toxic şi acționează asupra diferitelor virusuri, dar acțiunea lui se limitează la celulele speciei producătoare; astfel, interferonii obținuți din surse animale oferă protecție limitată celulelor umane.

Producerea şi purificarea interferonului uman, pe scară largă este dificilă. Inserția genei umane pentru sinteza interferonului în genomul *E. coli* a permis obținerea de interferon la preturi accesibile.

Interferonul are acțiune *antipoliferativă* şi măreşte timpul de generație al celulelor tratate; aceasta explică acțiunea antitumorală.

Acțiunea imunomodulatoare a interferonului se exercită prin activarea funcțiilor citotoxice ale macrofagelor, leucocitelor cunoscute sub denumirea de natural killer (NK) şi a limfocitelor T citotoxice.

În cursul infecției, la organismele homeoterme, creşte dramatic (de peste 100 ori față de nivelul normal) concentrația plasmatică a unor proteine. Acest răspuns adaptiv la boală a fost numit răspuns de fază acută, iar proteinele se numesc *proteine de fază acută*.

Unele din aceste proteine acționează ca opsonine şi favorizează fagocitoza (ex. proteina C-reactivă care reacționează cu polizaharidul somatic C al pneumococilor).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Agresiunea gazdei

Când invazia microorganismului este masivă şi macrofagele nu reuşesc să le înglobeze, microorganismele ajung în sânge şi produc bacteriemii, care indică o infecţie invazivă şi o deficienţă a sistemului imun primar de apărare.

Microorganismele patogene posedă o serie de proprietăţi care le conferă capacitatea de a depăşi barierele primare de apărare. Producerea de enzime facilitează invazia organismului:

- Hialuronidaza şi streptokinaza produsă de streptococii hemolitici ajută la răspândirea rapidă în ţesuturi;
- Coagulaza, produsă de stafilococi, determină coagularea plasmei în jurul cocilor, formând o barieră protectoare împotriva fagocitozei;
- Lecitinaza, produsă de *Clostridium perfringens* determină hidroliza eritrocitelor şi necroza ţesuturilor; colagenaza, eliberată de aceeaşi specie degradează colagenul, proteină majoră a ţesutului fibros şi favorizează răspândirea infecţiei în ţesuturi;
- Leucocidinele, produse de streptococi, stafilococi, patogeni Gram-negativi, distrug leucocitele.

Agresiunea asupra gazdei are loc pe două căi: multiplicarea agentului patogen care produce distrugerea mecanică a ţesuturilor, prin interferenţa cu metabolismul celular normal şi prin toxinele elaborate – exotoxine şi endotoxine care afectează ţesuturile sau organele gazdei.

Mecanismele specifice de apărare

Toate animalele, vertebrate şi nevertebrate se apără contra bacteriilor prin mijloacele non specifice: fagocitoza şi substanţele umorale non specifice (apărarea umorală).

La vertebrate a apărut sistemul imunitar specific: celulele limfoide şi anticorpii.

Microorganismele care au scăpat mecanismelor de apărare non specifice au de înfruntat mecanismele de apărare specifice. Stimularea răspunsului imun specific are loc sub acţiunea microorganismelor invadante, denumite *imunogene*.

Acestea determină apariţia unor globuline serice modificate, numite *imunoglobuline*.

Antigenul este o substanţă care prin stimularea imunoglobulinele care capătă proprietatea de a se combina cu antigenul care a stimulat anticorpii.

Încă nu se cunoaşte dacă toate imunoglobulinele funcţionează ca anticorpi. Antigenele bacteriene sunt proteine, polizaharide, lipide sau lipopolizaharide cu greutate moleculară mare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacția antigen-anticorp este înalt specifică, specificitate dată de diferențele compoziției chimice ale suprafețelor externe ale organsimului. Sinteza şi eliberarea de anticorpi în fluidele organismului reprezintă *răspunsul umoral imun.*

Antigenele pot induce un al doilea tip de răspuns, *răspunsul mediat celular*; antigenul stimulează apariția limfocitelor "sensibilizate" care asigură protecția față de bacteriile ce trăiesc şi se multiplică în celulele gazdei. Unele din aceste limfocite intervin şi în rejecția grefelor de țesuturi.

Structura antigenică a celulelor microbiene

Pe suprafața celulei bacteriene sunt diferite antigene, unele comune pentru variate specii, altele prezente doar la un grup (înalt specifice).

În celula bacteriană intactă sun prezente trei grupe de antigene:

Antigenele H sunt asociate cu flagelul care asigură şi mobilitatea bacteriei. Flagelul are o compoziție chimică care diferențiază între ele bacteriile, determinând producerea de anticorpi diverşi utilizați pentru identificarea tipurilor de *Salmonella.*

Antigenul O somatic este asociat cu peretele celular. Unitățile monozaharidice repetate de 10-25 ori dispuse la partea externă a lipopolizaharidului, sunt caracteristice pentru specie sau tip şi alcătuiesc antigenul O al bacteriilor Gram negative.

Prin cultivarea pe medii artificiale, în urma unor mutații, capacitatea de sinteză a antigenului O poate fi pierdută şi bacteria trece la forma de cultură R, cu pierderea virulenței.

La bacteriile Gram-pozitive, acizii teicoici sunt importante antigene de suprafață.

Antigenele de suprafață. Numeroase bacterii au în jurul peretelui celular un strat polizaharidic-*capsula*, care posedă proprietăți antigenice.

Astfel, în grupul *Pneumococcus* se pot identifica peste 80 tipuri serologice, care se diferențiază prin polizaharide distincte imunologic.

La unele specii Gram-negative (ex. *Salmonella*) microcaspula polizaharidică are proprietăți antigenice şi este răspunzătoare de virulența bacteriei. Antigenul V_i din microcapsulă este important pentru producerea vaccinurilor tifoide.

Celulele implicate în imunitate

Celulele cu rol în sistemul imunitar, distribuite în organism, se formează în principal în organele limfatice primare (timus şi măduva osoasă) şi în organele secundare sau periferice (nodulii limfatici, splină, plăcile Peyer – țesut limfoid prezent în submucoasa intestinului subțire, amigdale).

BCUIAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un număr mare de celule implicate în răspunsul imun, se formează la nivelul măduvii osoase.

Limfocitele domină în răspunsul imun dar şi monocitele – macrofage, celule endoteliate, eozinofile, mastocite, au anumite funcţii imunitare. Imunitatea mediată celular şi imunitatea umorală sunt dependente de două tipuri de limfocite: B şi T.

Imunitatea umorală

Imunitatea umorală cunoscută ca imunitatea mediată prin anticorpi este dată de reacţia dintre anticorpii circulanţi şi antigen cu participarea complementului.

Limfocitele B şi T părăsesc organele limfoide primare ca celule imunocompetente, capabile să reacţioneze cu antigenul. Un antigen poate avea mai mulţi determinanţi numiţi *epitopi*, şi fiecare reacţionează cu un anticorp.

Fiecare limfocit B recunoaşte doar un epitop prin intermediul receptorilor de pe suprafaţă.

Activarea celulelor B are loc prin legarea antigenului de receptorul de suprafaţă şi complexul format este supus ingestiei.

Limfocitele care au reacţionat cu antigenul corespunzător sunt stimulate şi proliferează diferenţiat în organele limfoide secundare: limfocitele B, în plasmocite, celule secretoare de imunoglobuline, iar limfocitele T în subpopulaţii de celule efectoare, limfocite T citotoxice (T_C), limfocite T implicate în sensibilizarea întârziată (T_D). Citokinele, molecule peptidice (interleukine)- produse de o subpopulaţie a limfocitelor T (limfocite ajutătoare). sau celule T helper , T_H) stimulează proliferarea limfocitelor B în celule care secretă anticorpi şi celule care nu se divid, cu durată de viaţă lungă: celule de memorie.

Antigenele care necesită prezenţa limfocitelor helper se numesc antigene dependente.

Numeroase antigene cum ar fi LPS, substanţe polimerice cum ar fi dextranii, levanul, pot induce sinteza anticorpilor în absenţa celuleor T helper şi se numesc antigene T independente.

Imunoglobulinele (I_g) sunt asociate cu fracţia γ - globulinică a proteinelor plasmatice dar nu toate imunoglobulinele se manifestă ca anticorpi.

Imunoglobulinele sunt proteine policatenare formate prin asocierea unor lanţuri uşoare, (L, light) şi grele (H, heavy), după formula generală (L-H-H-L)*n*, unde *n* poate fi între 1-5. Lanţurile polipeptidice sunt legate între ele prin punţi disulfidice (-S-S-), (Fig.9.1).

Imunoglobulinele sunt destul de rezistente la digestia proteolitică, dar anumite enzime cum ar fi papaina, pot rupe molecula în 3 fragmente cu aceeaşi dimensiune: 2 fragmente *Fab* care poartă, fiecare un singur situs de combinare cu antigenul şi un fragment *Fc* format din jumătatea terminală

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a lanțurilor grele, care poartă situsuri citofile (de fixare pe receptorii de membrană ai celulelor). Ele sunt markeri de suprafață ai limfocitelor B.

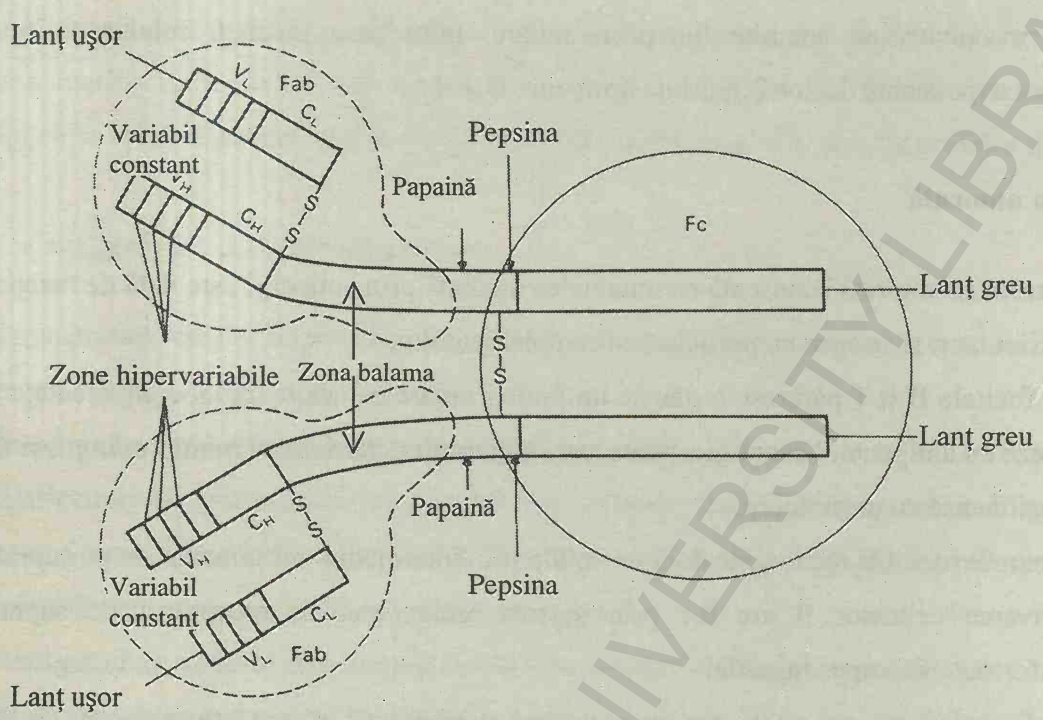


Fig.9.1 Structura schematică a moleculei de imunoglobulină

Imunoglobulinele umane se grupează, după structura chimică, în 5 tipuri. Imunoglobulinele de suprafață funcționează ca receptori specifici pentru antigeni.

Clasele de imunoglobuline

Imunoglobulinele M (IgM)

Inițial aceşti receptori sunt IgM apoi IgD, dar prin maturarea limfocitelor B, devin receptori care aparțin clasei de Ig pe care celula a fost programată să o secrete: IgM, IgG, IgA, IgE.

Sinteza acestei clase este determinată de primii stimului antigenici. Sunt foarte buni agenți de aglutinare, prezenți în număr mare în sânge şi deoarece apar devreme ca răspuns la infecție, au o importanță deosebită. Concentrația serică este de 0,5 – 2,5 mg/ml. *IgM* poate fixa complementul şi o singură moleculă poate iniția reacția în cascadă a acestuia. *IgM* sunt cele mai importante imunoglobuline de pe suprafața limfocitelor B, deoarece acționează ca antigen-receptor.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Imunoglobulinele G (IgG)

Sunt imunoglobulinele cele mai importante sintetizate pe parcursul răspunsului secundar; valorile serice normale sunt de 10 – 15 mg/ml. Pot străbate placenta şi asigură o linie importantă de apărare antiinfecţioasă pentru nou-născut şi pot fi suplimentate prin transferul din colostru, la nivelul mucoasei intestinale. Difuzează rapid în spaţiile extravasculare şi neutralizează toxinele bacteriene, prin fixarea pe suprafaţa capsulei sau a peretelui bacteriei rezistente la ingestie. *IgG* facilitează procesul de fagocitoză (opsonizarea). Complexele *IgG* cu celula bacteriană activează complementul cu efecte favorabile pentru gazdă.

Imunoglobulinele A (IgA)

Sunt prezente în secreţiile seromucoaselor: salivă, lacrimi, secreţii nazale, transpiraţie, colostru, secreţii pulmonare, urogenitale, ale tractusului gastrointestinal. Rolul lor este de a proteja suprafeţele externe de agresiunea microbiană, previn aderenţa microorganismelor la suprafaţa celulelor mucoasei împiedicând pătrunderea în ţesuturi. Nivelul seric normal este de 0,5 – 3mg/ml, dar în secretii concentraţiile sunt mai mari.

Imunoglobulinele D (IgD)

În condiţii normale, concentraţia serică este scăzută (30-50 μg/ml) dar sunt componenţi dominanţi pe suprafaţa celulelor B mature.

Imunoglobulinele E (IgE)

Prezenţa în ser este foarte scăzută (0,1-0,3 μg/ml) dar sunt imunoglobuline importante. Au afinitate mare pentru mastocite şi bazofile. Fixarea anumitor microorganisme pe anticorpul legat de celulele pentru care IgE au afinitate, duce la degranularea acestora şi eliberearea de histamine şi alţi compuşi vasoactivi.

În general antitoxinele bacteriene aparţin clasei *IgG*, antipolizaharidele clasei *IgM*.

Răspunsul umoral realizat dominant prin opsonizarea şi neutralizarea toxinelor bacteriene, este un răspuns eficient faţă de bacteriile cu multiplicare extracelulară, invazive şi a bacteriilor toxigene, neinvazive.

Reacţia antigen-anticorp

Moleculele de anticorpi sunt bivalente iar antigenele pot fi polivalente. În urma combinării rezultă un complex solubil mic sau un agregat mare insolubil, funcţie de natura celor două molecule din sistem.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Între antigen şi anticorp pot avea loc diferite reacţii:

1. *Neutralizarea.* Complexele formate sunt mici, solubile, care neutralizează toxinele microbiene.
2. *Precipitarea.* Se formează precipitate insolubile care permit ca fagocitele să elimine antigenul solubil din organism.
3. *Aglutinarea.* Agregarea bacteriilor sub formă de glutinate, permite fagocitelor să le elimine rapid din organism.
4. *Reacţii citotoxice.* În urma reacţiei anticorp-bacterie rezultă liza celulei. Pentru ca reacţia să se desfăşoare este necesară şi prezenţa complementului.

Activarea moleculei de complement are loc prin clivarea proteolitică a moleculei. Complementul poate fi activat pe două căi: calea clasică şi calea alternativă (Fig.9.2).

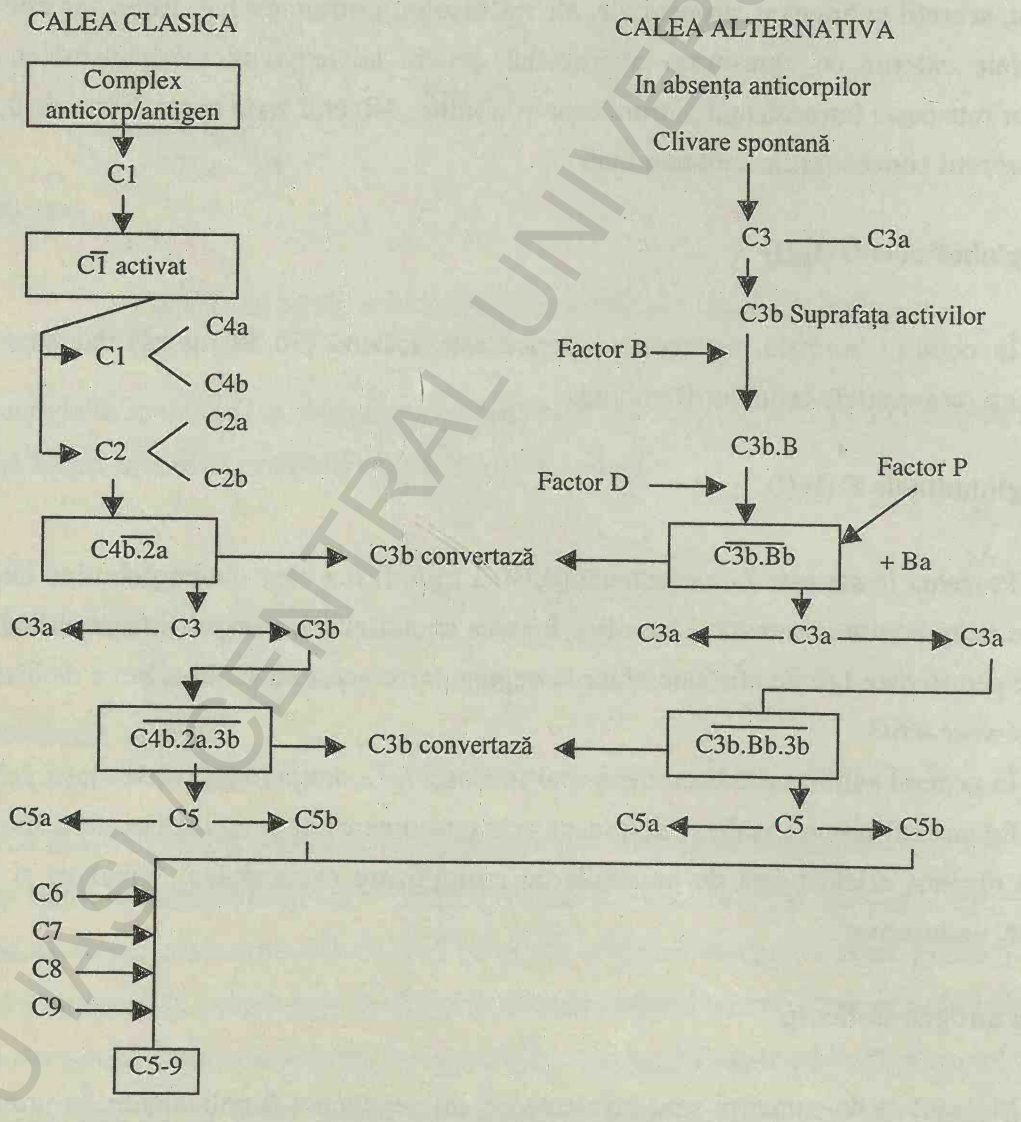


Fig.9.2 Căile de activare a complementului

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Calea clasică

Primul component este *C1*, un complex de 3 molecule denumite *C1q, C1r* şi *C1s*. Calea clasică este iniţiată de complexele anticorp-antigen când *C1q* se fixează pe fragmentul *Fc* a anticorpului *IgM* sau *IgG* şi activează moleculele *C1r* şi *C1s*. Asocierea *C1rsq* clivează componentele *C4* şi *C2* (componente ale complementului care au activitate enzimatică) în 2 fragmente: *C4a* şi *C4b* care se leagă de suprafaţa unei molecule *C1* din apropiere.

C2 clivează în 2 fragmente: *C2a* şi *C2b*; *C2a* se fixează pe *C4b* şi formează complexul *C4b2a* care este *C3-C5* convertaza căii clasice. *C5* clivează în *C5a* şi *C5b* şi este ultima moleculă care contribuie la ansamblarea câte unei molecule de *C6, C7* şi *C8*.

Rezultă complexul *C5b.6.7.8* care permite polimerizarea în *C9* într-o structură tubulară hidrofobă inserată în membrana celulei prin care ionii şi moleculele mici difuzează liber. Această structură se numeşte complexul de atac al membranei.

C3a şi *C5a*, eliberate în lichidul înconjurător acţionează ca anafilatoxine potenţiale, care determină eliberarea de substanţe vasoactive cum ar fi histamina, din mestocite şi bazofile. *C5a* are de asemenea acţiune chemotactică puternică pentru neutrofile.

Fragmentele libere de *C3b* se prind de suprafaţa celulei ţintă care devin astfel receptorii specifici pentru PMN şi macrofage, facilitând fagocitoza.

Calea alternativă

Clivarea fragmentului *C3* şi activarea cascadei complementului poate avea loc în absenţa complementului fixator de anticorpi, prin intermediul unor agenţi bacterieni, cum ar fi polizaharidele. *C3* clivează spontan în ser şi *C3b* care se formează este inactivat rapid (factorii I şi H). Dar *C3b* fixat pe suprafaţa bacteriilor rămâne activ şi se poate prinde şi de factorul B, o proteină serică, care din nou poate cliva sub acţiunea unei alte proteaze serice, numită factor D. Complexul format, *C3bBb* este stabilizat de o altă proteină, properdină (P). Complexul stabil rezultat (*C3bBb*) este o *C3* convertază care clivează *C3* pentru a forma complexul multimolecular *C3b.B6.3b*, care este *C5* convertază şi poate genera *C5b* care este veriga de bază pentru asamblarea complexului de atac al membranei.

Controlul activităţii complementului

Producerea spontană de *C3b* poate iniţia cascada complementului, mecanism care poate fi prevenit prin două proteine reglatoare. Factorul I inactivează *C3b* dacă acesta nu este fixat pe

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

suprafața celulei bacteriene. Acțiunea este intensificată de factorul H care împiedică fixarea *Bb* la complexul *C3b.Bb*, cu inactivarea *C3* convertazei. În calea clasică, *C1* ar trebui teoretic să-şi continue clivarea în moleculele *C4* şi *C2* până la consumarea completă. Dar prezența în ser a unui inhibitor pentru *C1* (*C1 INH*) previne activarea prin fixarea de acesta.

Complementul are rol semnificativ în apărarea organismului; determină liza bacteriilor Gram-negative ca urmare a acțiunii lisosimului asupra legăturilor peptidoglicanului. Formarea de complexe *C3b* la suprafața celulei facilitează procesul de fagocitoză (fagocitele au receptori pentru *C3b*). *C3a* şi *C5a* determină eliberarea de histamină care creşte permeabilitatea vasculară şi afluxul de anticorpi în zona infectată; de asemenea aceste fracțiuni atrag fagocitele spre focarul infecțios.

Absența sau concentrațiile scăzute ale diferitelor componente ale complementului determină receptivitatea crescută la infecții.

Imunitatea mediată celular

Acest tip de imunitate se referă la reacțiile localizate care au loc în urma infecțiilor cauzate de microorganisme parazite intracelular. Reacțiile sunt mediate de limfocite şi fagocite.

Limfocitele care mediază imunitatea celulară îşi au originea în măduva osoasă şi pe cale sanguină ajung în timus unde proliferează şi dobândesc capacitatea de a se localiza în organele limfoide periferice, mai ales în splină şi ganglionii limfatici; sunt denumite limfocite "T".

Limfocitele T mature au un receptor (T cell receptor, TCR) care este asociat cu un marker de suprafață a celulei *CD3*; antigenul recunoaşte complexul *TCR/CD3*. Celulele T mature mai posedă şi alți markeri, dintre care *CD4* şi *CD8*.

Infecția cu virusul imunodeficienței umane (human immunodeficiency virus, HIV) poate determina distrugerea celulelor T helper, celule importante pentru sistemul imun.

Sistemul imun trebuie să posede capacitatea de a face distincție între antigene, împotriva cărora răspunsul imun trebuie să fie benefic şi cazul când acest răspuns ar putea fi dăunător organismului, adică trebuie să facă distincția între"self" şi "non-self" (legitim şi nelegitim). Recunoaşterea se face pe baza complexului de histocompatibilitate, ai cărui produşi sunt exprimați pe suprafața celulelor care devin astfel capabile să recunoască şi să semnaleze antigenele.

Principalele clase de limfocite

Limfocitele T_H (ajutătoare) au rol esențial în activarea altor celule implicate în răspunsul imun, prin producerea altor mediatori de natură peptidică numiți *citokine*. Citokinele produse de celulele T_H activate stimulează proliferarea celulelor B, asociate cu răspunsul umoral.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Limfocitele T supresoare (celulele T_s)

Limfocitele T_s au rolul de a inhiba faza de activare a răspunsului imun prin producerea de citokine cu funcție inhibitoare; pot absorbi factorii necesari creşterii şi diferențierii şi eliberează factori solubili specifici care acționează asupra celulelor T_H sau celulelor B.

Receptorii de pe celulele T_s recunosc antigenul cu care acționează printr-o punte între T_s şi țintă sau alternativ, receptorul de pe celulele T_s poate fi o imagine în oglindă a receptorului de pe celula țintă şi produce direct supresia prin legarea de el. Celulele T_s au pe suprafața lor CD8.

Limfocitele T citotoxice (celulele T_C)

Celulele infectate cu virusuri ca şi grefele de țesut obținut de la un donor diferit genetic pot stimula formarea de celule T care sunt toxice pentru acestea (celule T_C). Celulele T_C au pe suprafața lor markerii CD8.

Celulele nule

Celulele nule sunt lipsite de markerii de suprafață prezenți pe limfocitele T şi B.

Celulele NK (*natural killer*) sunt limfocite prezente în sânge şi țesuturile limfatice, mai ales în splină; provin din măduva osoasă. Celulele NK au abilitatea de a omorâ anumite linii de celule tumorale sau celule infectate cu virus. Cel mai important rol al celulelor NK este în prima linie de apărare în infecțiile virale, deoarece acestea nu necesită un contact anterior cu antigenul, pentru a putea răspunde. Acestea sunt eficiente asupra celulelor infectate cu virus înainte de a se forma anticorpii şi celulele T_C antigen-specifice.

O populație separată de celule NK, numite celule ucigaşe (Killer, K) au pe suprafața lor receptori pentru *Fc* ai anticorpilor *IgG* fixați pe celula țintă (celule tumorale, celule infectate cu virus); celulele K funcționează ca celule citotoxice dependente de anticorpi.

Toleranța imunologică

Toleranța imunologică reprezintă incapacitatea de a elabora un răspuns imun la un anumit antigen, prin supresia activă sau inactivarea specifică a limfocitelor antigen-reactive.

Toleranța imunologică naturală constă în incapacitatea organismului de a elabora răspuns imun față de structurile proprii şi se instalează în perioada embrionară.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Contactul structurilor proprii cu sistemul imun ar opri dezvoltarea mecanismelor de recunoaştere şi de activare a limfocitelor corespunzătoare acestor antigene.

Lipsa de reactivitate a acestor limfocite (clone "interzise") se menţine toată viaţa. În condiţii patologice reactivarea clonelor interzise duce la formarea de autoanticorpi implicaţi în boli autoimune.

Toleranţa imunologică dobândită

Capacitatea unui organism, apărută în cursul vieţii de a nu declanşa un răspuns imun la unul sau mai multe antigene (tolerogene) poartă denumirea de *toleranţă imunologică dobândită.*

Cu cât antigenul este mai înrudit cu structurile proprii ale gazdei, cu atât este mai tolerogen.

Toleranţa poate fi dobândită prin diferite căi:

- Îndiferenţa genetică: dacă organismul pierde capacitatea genetică de a recunoaşte antigenul, el devine "imunologic tăcut";
- T – supresia: celulele T_s pot fi activate mai eficient decât celulele T_H şi astfel răspunsul imun este suprimat;
- Limfocitele T sunt mai uşor tolerate decât limfocitele B şi dacă acestea sunt incapabile de a activa celulele B, aceste celule sunt considerate "imobilizate";
- Deleţia clonală. Contactul cu antigenul la nou-născut duce la moarte sau inactivarea permanentă a dezvoltării limfocitelor.

Autoimunitatea

O proprietate fundamentală a sistemului imun este absenţa reacţiei faţă de constituienţii proprii organismului. Totuşi experienţa clinică a demonstrat că sunt anumite boli în care pacientul aparent îşi distruge propriile celule. Reacţia implică celulele T_C , B sau NK şi rezultatul reacţiei antigen-anticorp constă în apariţia unei stări patologice (boală autoimună).

Hipersensibilitatea imunologică

Nu toate reacţiile antigen-anticorp sunt un beneficiu pentru organism; uneori complexele formate produc distrugeri ale ţesuturilor. Funcţionarea defectuoasă a sistemului imun este denumită *reacţie de hipersensibilitate.*

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste reacții se grupează în 5 tipuri principale: primele trei necesită reacția antigen-anticorp umoral şi manifestarea este rapidă – hipersensibilitatea imediată; tipul al patrulea (hipersensibilitate întârziată) impune prezența celulelor T şi simptomele reacției apar după 24 ore; tipul al cincilea necesită ca anticorpii să stimuleze funcția celulei.

Reacțiile de tip I (anafilactice)

În aceste reacții antigenul reacționează cu anticorpii care sunt legați de suprafața mastocitelor prin porțiunea *Fc*.

Efectul fixării este eliberarea de histamine responsabile de fenomene anafilactice. Simptomele reacției care apar depind de distribuirea celulelor pe care s-au fixat anticorpii: reacții alergice care afectează tegumentul (urticaria) mucoasa nazală (rinita), ochii (conjunctivite), căile respiratorii inferioare (astmul bronşic), sistemul cardiovascular (şocul anafilactic).

Anticorpii implicați în aceste reacții sunt în principal *IgE* dar uneori şi *IgG*. Când antigenul sensibilizant (alergenul) este inoculat parenteral, în doză mare (penicilină, procaină, etc.) apare o reacție sistemică manifestată prin urticatrie, colaps circulator şi şoc.

Anafilaxia poate fi produsă de diverse antigene: veninuri, proteine vegetale, animale, bacteriene, enzime şi antigene poliozidice. Fenomenul poate fi combătut prin administrarea de antihistaminice care anihilează efectele produse de compuşii histamici.

Aproximativ 10% din populație suferă de reacții alergice le alergeni ca polen, păr şi pene, praf, mucegaiuri, alimente: ouă, peşte, căpşuni.

Reacțiile de tip II (sau citolitic-citotoxice)

Aceste reacții necesită prezența unor celule sau țesuturi. Combinația anticorpilor circulanți cu antigenul de pe suprafața celulelor duce la degradarea celulelor prin fagocitoză. Activarea completă a sistemului complement duce la liză. În infecția cu virusul hepatitei B, celulele hepatice exprimă pe membrană antigene virale şi devine astfel ținta de atac pentru complement, celulele K sau macrofage.

Tipul II de reacție induce distrugerea eritrocitelor prin anticorpi citolitici în cazul transfuziilor incompatibile.

Tipul III (reacții mediate de complexe imune)

Reacțiile de tip III sunt date de prezența complexelor imune aflate în circulație sau în spațiul extravascular, care se localizează în rețeaua de capilare, unde, asociate cu complementul şi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

polimorfonuclearele produc leziuni ale țesuturilor.

În acest grup se diferențiază două tipuri de reacții:

- *Reacția tip Arthus* este un fenomen local şi apare când anticorpul este în exces. Complexele imune formate la locul pătrunderii antigenului determnă o reacție inflamatorie acută;
- *Reacții tip boala serului*, apar când antigenul este în exces față de anticorpi, ducând la formarea complexelor solubile care puse în circulație determină reacții sistemice sau sunt depozitate în rinichi, articulații, tegument. Temperatura creşte, apare un rash urticarian, tumefiarea ganglionilor limfatici, dureri articulare. Albuminuria sugerează leziunile de glomerulonefrită, ca urmare a formării depozitelor de Ig şi C3. Boala serului apare după administrarea în scop terapeutic de doze repetate de seruri imune heterologe (ser antidifteric, antitetanic preparate pe cal).

Reacții de tip IV (sensibilizări de tip întârziat)

Aceste reacții sunt determinate de limfocite T sensibilizate la contactul secundar cu antigenul sensibilizant.

Reacțiile sunt inițiate de formarea complexelor între celulele T antigen-specifice şi antigen cu eliberarea de limfokine, care afectează mai ales macrofagele. Prezența anticorpilor şi a complementului nu este necesară.

Exemplul tipic al acestor reacții este *reacția la tuberculină*. Subiecții care au avut o infecție prealabilă cu *Mycobacterium tuberculosis* au celulele T sensibilizate la extractul proteic obțiunt din acest bacil.

Injecția intradermică cu extractul proteic produce, după 24 ore, un răspuns inflamtor la nivelul tegumentului, caracterizat prin eritem şi indurație.

Reacții împotriva celulelor infectate viral sau a celulelor din transplant au ca rezultat stimularea transformării limfocitelor în celule T_C care pot elimina țintele celulare ce posedă antigen sensibilizant.

Tipul V (reacții de hipersensibilitate de contact)

Este o alergie care se produce în urma acțiunii unui agent iritant (compuşi chimici macromoleculari) şi duce la sensibilizarea față de acest agent.

Proteinele tisulare alterate sub acțiunea agentului chimic se combină cu agentul iritant formând un antigen complet.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transplantul de țesuturi

Alergia la transplant este o hipersensibilitate de tip întârzit. Țesuturile transferate dintr-o zonă în alta la acelaşi individ (autografe) sau între indivizi identici genetic sunt întotdeauna reuşite , în schimb grefele între indivizi genetic diferiți sunt totdeauna un eşec.

Grefele între indivizi genetic diferiți ai aceleaşi specii (alografe) sau între specii diferite (xenografe) declanşează un răspuns imun intens şi sunt eliminate. Limfocitele organismului receptor se sensibilizează față de antigenele din țesutul grefat şi după câteva zile, se dezvoltă o reacție de hipersensibilizare de tip întârziat, care duce la respingerea grefei.

Răspunsul imun la tumori

Este posibil ca celulele alterate, potential maligne, să fie recunoscute de sistemul imun şi eliminate. Celulele canceroase au pe suprafață antigene care au fost identificate şi încadrate în trei grupe:

- Antigene induse viral care apar prin transformarea malignă a celulei sub acțiunea virusurilor oncogene. Acestea produc un răspuns imun puternic în experimentele pe animal;
- Celulele transformate prin agenți chimici cancerigeni, au pe suprafață antigene care determină un răspuns imun slab;
- Tumorile apărute natural, produc un răspuns imun foarte slab sau nul;aceste celule scapă de supravegherea imună normală.

Stimularea răspunsului imun prin utilizarea imunoterapiei în scopul prevenirii sau tratării afecțiunilor maligne este încă în stadiu de cercetare; rezultatele obținute până acum nu au demonstrat decât o eficiență limitată.

Tipurile de imunitate

Imunitatea, starea de relativă rezistență la infecție, se grupează, după origine în: imunitate naturală (înnăscută) şi imunitate dobândită.

Imunitatea naturală

Este o stare de nereceptivitate naturală, determinată de particularități anatomo-funcționale ale unei specii. Imunitatea naturală se împarte în:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Imunitatea de specie* care se transmite ereditar. Omul este sensibil la boli față de care alte animale sunt imune şi invers (între specii sunt diferențe biochimice, de temperatură a corpului, etc.);
- *Imunitatea individuală*. Deşi imunitatea înnăscută este absolută pentru specie, ea poate avea un caracter relativ pentru individ. În cadrul speciei, variațiile imunității naturale între indivizi poate depinde de starea de sănătate, vârstă, echilibrul hormonal, etc.

Imunitatea dobândită

Se subdivide în imunitatea dobândită activ şi imunitatea dobândită pasiv, fiecare dintre ele putând fi indusă natural sau artificial.

Imunitatea dobândită activ se produce prin stimulări antigenice care pot fi naturale, în urma unor infecții clinice sau subclinice, sau artificiale, prin introducerea deliberată în organism a unui antigen adecvat sub formă de vaccin. Imunitatea după vaccinare durează de la unul la câțiva ani.

Imunitatea dobândită pasiv, nu necesită intrarea în acțiune a mecanismelor de apărare proprii şi produce o protecție imediată, dar de scurtă durată.

Aceasta se obține prin transfer, la receptor, a anticorpilor preformați, fie pe cale naturală (pasajul transplacentar al anticorpilor de la mamă la făt şi prin lapte) sau artificial, prin administrarea de anticorpi preformați în alt organism uman sau animal (ex. cal, care se utilizează pentru producerea serurilor antitoxice). Durata imunității depinde de rata de degradare a anticorpilor (care au o durată scurtă de viață).

Bibliografie

Zarnea G. *Tratat de Microbiologie Generală*, Ed. Academiei Române, vol.4: 45-124, 1990.

Haynes BF, Fauci AS. *Bolile sistemului imun. Bazele celulare şi moleculare ale imunității.* In: Harrison – Principiile Medicinei interne, ediția a XIII-a, Ed. Teora: 1711-1727, 1998.

Buiuc D. *Microbiologie Medicală*, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti: 147-201, 1992.

Kaufmann SHE, Flesch. *Cell mediated immunity, immunodeficiency and microbial infections.* In: Perspectives in antiinfective therapy. Eds: Jackson GG, Schlumberger HD, Zeiller HJ., Friedr. Vieweg and Sohn Braunschweig/Wiesbaden; 165-173, 1988.

Hahn H, Kaufmann SHE. *Role of cell-mediated immunity in bacterial infections,*. Rev Infect Dis, 3:1221-1250, 1981.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

AGENTI CU ACTIUNE ANTIMICROBIANA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10

Antibiotice

Antibioticele, în sens strict, sunt agenți antimicrobieni naturali, produşi de microorganisme: ciuperci şi diverse bacterii.

Unele antibiotice sunt actual produse de sinteză şi multe sunt derivați semisintetici obținuți prin modificări chimice ale produşilor naturali.

Alte medicamente antibacteriene sunt substanțe chimice de sinteză cu aceleaşi proprietăți ca şi antibioticele:

- toxicitate selectivă orientată contra bacteriilor şi legată direct de activitatea acestora (inhibarea anumitor procese metabolice);
- efect antibacterian manifestat în concentrații scăzute, de ordinul mg/l;
- efect relativ lent, pe parcursul a câteva ore, bacteriostatic sau bactericid.

Acțiunea antibacteriană a antibioticelor nu se extinde asupra tuturor speciilor bacteriene; este necesară precizarea *spectrului de activitate*, adică stabilirea speciilor asupra cărora sunt active.

Activitatea se poate extinde asupra majorității speciilor patogene Gram pozitive şi Gram negative – antibiotice cu *spectru larg*, sau poate fi restrânsă – antibiotice cu *spectru limitat.*

Spectru de activitate al unui antibiotic depinde de rezistența naturală a tulpinilor denumite "sălbatice".

În urma unor modificări genetice este posibil să apară *rezistența dobândită*, a cărei frecvență poate creşte datorită presiunii selective exercitate de antibiotice în cursul utilizării clinice şi care limitează astfel spectrul inițial.

Activitatea antimicrobiană este testată în laborator şi este definită ca cea mai mică concentrație la care antibioticul inhibă multiplicarea microorganismelor (concentrație minimă inhibitorie sau CMI).

Activitatea bactericidă se referă la abilitatea agenților chemoterapeutici de a omorâ microorganismele; se defineşte ca cea mai mică concentrație de antibiotic care omoară microorganismele sau CMB.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b). prevenirea apariției microorganismelor rezistente în cursul terapiei;

c). obținerea unui efect sinergic de omorâre.

Sinergismul se referă la combinația a două antibiotice (ex. penicilină şi streptomicină) care măreşte activitatea bactericidă când sunt testate împreună,comparativ cu a fiecăruia singur(Fig.10.1)

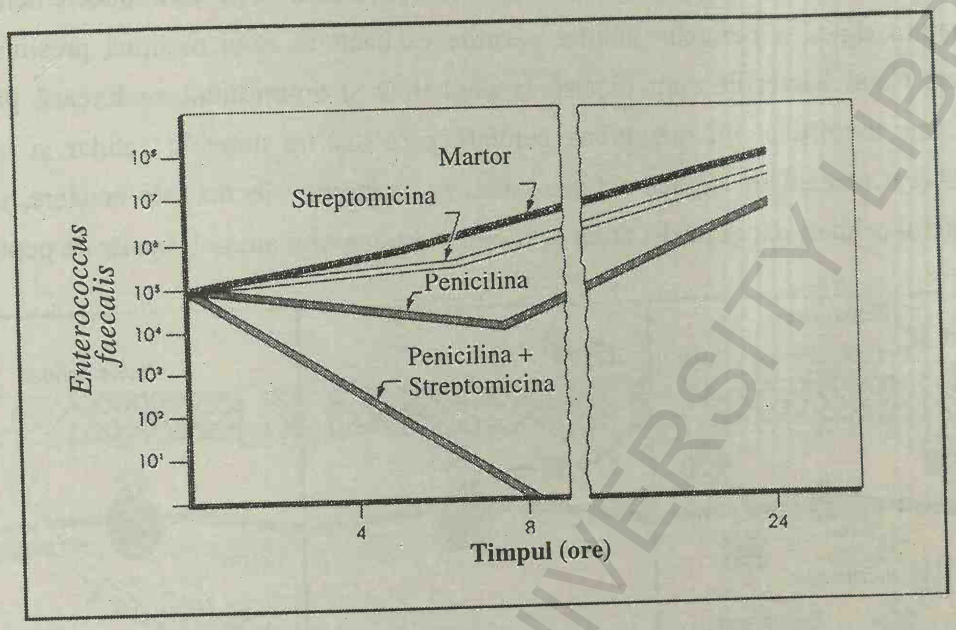


Fig.10.1 Combinația sinergică a două antibiotice

Antagonismul se referă la situațiile când un antibiotic interferă cu acțiunea bactericidă a altui antibiotic.

Combinațiile sunt considerate indiferente dacă activitatea în combinație este egală cu a fiecărui agent separat.

Mecanismele de actiune ale agenților chemoterapeutici

Acțiunea antibioticelor începe prin fixarea pe celulele sensibile şi inițierea unui lanț de reacții care în final duc la oprirea diviziunii (*efect bacteriostatic*) sau la moartea celulei prin autoliză (*efect bactericid*).

Mecanismele de bază ale actiunii antibioticelor sunt:

1. Inhibarea sintezei peretelui celular;
2. Alterarea membranelor celulare;
3. Inhibarea sintezei proteinelor;
4. Inhibarea sintezei acizilor nucleici;
5. Activitatea antimetabolică sau antagonismul competitiv.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.Antibioticele care inhibă sinteza peretelui celular

Încorporarea precursorilor în timpul sintezei peretelui celular este catalizată de enzime specifice (ex. transpeptidaze şi carboxipeptidaze) care se mai numesc proteine de legare a penicilinelor (penicillin binding proteins, PBP), deoarece se fixează pe antibioticele beta-lactamice.

Structura rigidă a peretelui celular permite ca bacteria să-şi menţină presiunea osmotică internă mare. Când bacteriile sunt expuse la penicilină şi antibioticul se fixează pe PBP, sunt activate enzime autolitice din membrana celulară care distrug peretele celular şi celula moare (Fig.10.2). Acest mecanism explică acţiunea acestor antibiotice în faza de creştere, când are loc sinteza peretelui celular, dar şi neafectarea celulelor organismului animal, lipsite de peptidoglican.

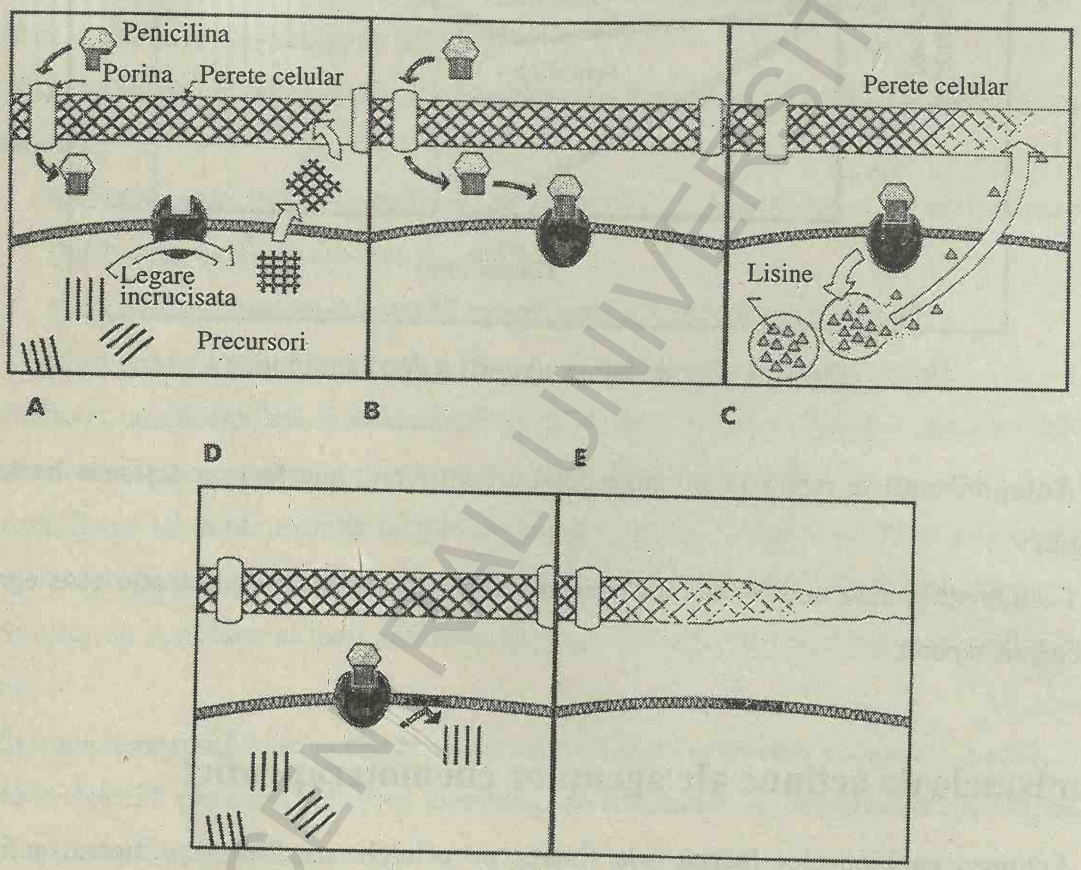


Fig.10.2 Inhibarea sintezei peretelui celular

A - Precursorii sunt legaţi de PBP şi încorporaţi în peretele celular; **B** – Penicilinele pătrund prin porine şi se fixează pe PBP; **C** – Se eliberează autolisine care distrug peretele celular; **D** – După fixarea pe PBP, acestea nu mai pot contribui la sinteza proteinelor esenţiale pentru integritatea peretelui celular; **E** – Celula, cu peretele distrus, nu-şi mai poate menţine presiunea osmotică internă.

Beta-lactaminele, bacitracina, fosfomicina şi glicopeptidele (vancomicina, teicoplanina) inhibă sinteza peptidoglicanului, constituent esenţial al peretelui bacterian.

EDUARD CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Beta-lactaminele

Structura: nucleul de bază, ciclul beta-lactamic, permite încadrarea acestor compuşi în trei grupe, după natura ciclurilor şi a radicalilor asociaţi (Fig.10.3):

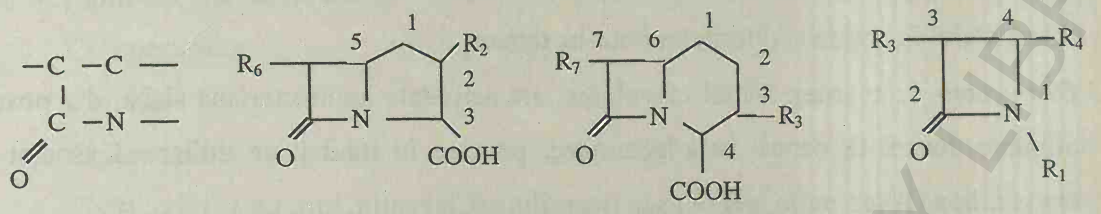


Fig.10.3 Structura beta – lactaminelor

a) nucleul de bază al beta-lactaminelor; b) grupele de beta-lactamine

Grupa I: pename, carbapeneme, oxapename

- *Pename*: penicilinele; după natura radicalului fixat pe carbonul 6, se disting;

- Penicilinele G şi V: active asupra bacteriilor Gram pozitive şi a cocilor Gram negativi, exceptând tulpinile producătoare de penicilinaze (care rup nucleul beta-lactamic şi inactivează penicilinele).

Penicilina G se administrează pe cale intramusculară sau intravenoasă; formele retard (procain-penicilina, benzatin-penicilina, benetaminpenicilina) se administrează intramuscular.

Penicilina V (orală) are absorbţie mai slabă.

- Penicilinele M – peniciline antistafilococice, rezistente la penicilinaza stafilococică; meticilina (inactivă pe cale orală), oxacilina şi dicloxacilina active per os.
- Penicilinele A, cu spectru larg, active şi asupra unor bacili Gram negativi, dar sensibile la beta-lactamazele bacililor Gram negativi şi penicilinaza stafilococică:

- *Aminopeniciline*: ampicilina, amoxicilina, hetacilina, metampicilina, pivampicilina; nu sunt active faţă de *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Carboxipenicilinele*. Spectru asemănător cu al aminopenicilinelor dar se extinde şi asupra bacililor Gram-negativi rezistenţi la aminopeniciline, *Pseudomonas aeruginosa*: carbenicilina, ticarcilina.
- *Ureidopenicilinele* au spectru asemănător cu cel al carboxipenicilinelor, dar acţiunea lor se extinde şi asupra anumitor bacili Gram-negativi rezistenţi la aminopeniciline şi carboxipeniciline. Ca şi carboxipenicilinele sunt inactive administrate oral.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Amidinopenicilinele*, active mai ales asupra bacililor Gram-negativi implicați în infecțiile urinare; mecilinam şi pivmecilinam (activ pe cale orală).
- *Inhibitori de beta-lactamaze*: sulbactam şi tazobactam utilizați în asociere fixă cu altă beta-lacamină.
    - *Carbapeneme*. Imipenemul, utilizat parenteral are un spectru larg de acțiune şi este foarte stabil la acțiunea diferitelor beta-lactamaze.
    - *Oxapename* (clavame): acidul clavulanic, are activitate antibacteriană slabă, dar posedă afinitate deosebită pentru beta-lactamaze, pe care le inhibă; se utilizează asociat cu amoxicilina (Augmentin, per os) sau ticarcilina (Claventin, i.m, i.v.)

Grupa II: Cefeme şi oxacefeme

Cefemele cuprind cefalosporinele în sens strict; 7 – alfa – metoxi – cefalosporinele se numesc cefamicine iar 1 – oxa – 7 alfa – metoxi cefalosporine, sint denumite oxacefeme.

Spectrul de acțiune al cefalosporinelor este larg, mai ales asupra bacililor Gram-negativi. Cefalosporinele injectabile sunt grupate, după activitatea antibacteriană, în 3 generații:

- Cefalosporine injectabile de generația I-a, rezistente la penicilinaze, dar sunt distruse de cefalosporinazele produse de numeroşi bacili Gram negativi; inactivate de *Pseudomonas aeruginosa*;

Cefalotina
Cefaloridina
Cefacetril
Cefazolin
Cefapirin

- Cefalosporinele injectabile de generația a II-a - sunt relativ mai rezistente la anumite cefalosporinaze; inactive asupra *Pseudomonas aeruginosa*:

Cefamandol
Cefuroxim
Cefoxitin

- Cefalosporinele injectabile de generația a III-a au activitate cu spectru larg şi rezistă la acțiunea cefalosporinazelor; unele au activitate anti – *Pseudomonas aeruginosa*:

Cefotaxim
Cefmenoxim
Ceftizoxim

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ceftriaxona

Latamoxef

Ceftazidim

Alte cefalosporine de generația a III-a sunt mai puțin active asupra enterobacteriilor, dar au unele proprietăți antibacteriene şi farmacocinetice avantajoase:

Cefoperazona

Cefotiam

Cefotetan

Cefsulodin

- Cefalosporinele orale pot fi grupate în 3 generații, după activitatea antimicrobiană ca şi cefalosporinele injectabile:

Cefpodoxim – proxetil

Cefadroxil

Cefalexina

Cefradin

Cefaclor

Cefatrizin

Cefuroxim – axetil

Cefixim

Cefalosporinele de generația a IV-a posedă în nucleul substituit în poziția C-7: 2 – amino – 5 tiazolil sau 5 amino – tiadiazolil. Acestea au spectru larg de activitate, inclusiv *Pseudomonas aeruginosa*. Dintre numeroşii compuşi care au fost sintetizați, în terapie se utilizează numai doi: cefpirom şi cefepim.

Grupa III: Monobactame

În prezent se utilizează aztreonamul inactiv pe cale orală, cu spectrul limitat la bacteriile aerobe Gram-negative. Activitatea este comparabilă cu a cefalosporinelor de generația a III-a; are stabilitatea față de beta-lactamaze şi este eficient asupra *Pseudomonas aeruginosa*.

Beta-lactaminele au efect bactericid, care urmare a lizei bacteriene în urma activării enzimelor autolitice car se asociază inhibării sintezei peretelui.

Farmacocinetica. Beta-lactaminele au difuzie moderată în țesuturi. Difuzia prin meninge este scăzută, dar în doze mari, administrate intravenos (penicilina G, aminopenicilinele, cefalosporinele de generația a III-a) sunt eficiente în terapia meningitelor. Se elimină predominant urinar, sub formă activă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toxicitatea este redusă, dar pot apare fenomene alergice, mai ales cutanate. Gradul lor de puritate influențează toxicitatea; pot sensibiliza organismul şi la o nouă administrare, este posibilă declanşarea şocului anafilactic.

Bacitracina, polipeptid activ numai asupra bacteriilor Gram-pozitive, este toxică şi nu se administrează pe cale generală.

Cicloserina, analog structural ala alaninei, împiedică încorporarea acesteia în peptidele peretelui celular.

Fosfomicina, antibiotic netoxic, cu spectru larg, este utilizată în asociere pentru evitarea selectării de mutanți rezistenți. Este utilizată în infecțiile date de stafilococii rezistenți la meticilină. Difuzia în țesuturi este bună; se elimină nemodificată, predominant urinar.

Vancomicina, glicopeptid activ asupra bacteriilor Gram pozitive se administrează strict i.v. în infecțiile cu stafilococi meticilin rezistenți şi enterococi.

Teicoplanina ca şi vancomicina, este activă în etapa finală a sintezei peptidoglicanului. Acționează asupra cocilor Gram pozitivi.

2.Antibiotice care alterează membranele celulare (membrana externă a peretelui bacteriilor Gram negativ şi membrana citoplasmatică)

Aceste antibiotice: polimixine, tirocidina, gramicidina, nistatina, amfotericina B, determină modificări fizico-chimice ale membranei concretizate prin alterarea permeabilității, efect similar celui produs de detergenți (Fig.10.4).

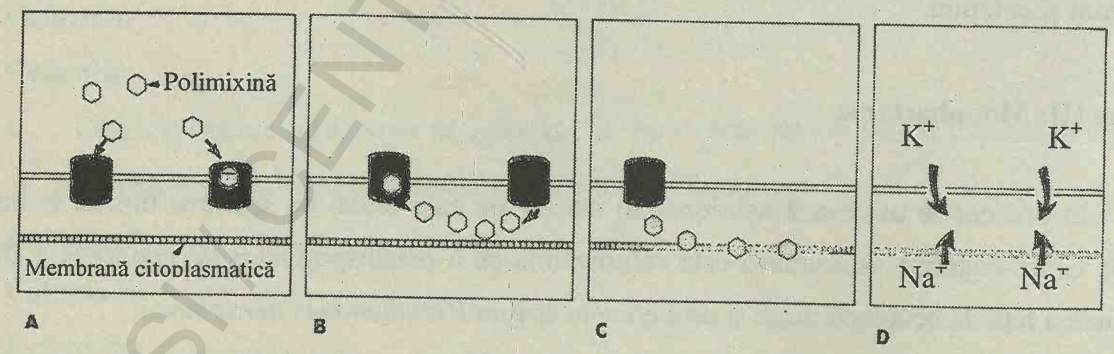


Fig.10.4 Alterarea membranelor celulare

A. Celula bacteriană;

B. Penetrarea polimixinei în interiorul membranei citoplasmatice

C. Distrugerea membranei citoplasmatice printr-un mecanism similar cu al detergenților

D. Pierderea integrității celulei urmată de moartea celulei

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Polimixinele sunt produse de diverse specii de *Bacillus*. Polimixina B şi polimixina S (colistin) sunt bactericide, active asupra bacililor Gram negativi; acţionează iniţial asupra membranei externe a peretelui, prezent numai la bacteriile Gram negative şi apoi asupra membranei citoplasmatice a cărei lezare duce la pierderea constituenţilor intracelulari.

Deoarece nu sunt resorbite la nivelul mucoasei gastro-intestinale şi nici distruse în tubul digestiv, sunt utilizate în tratamentul infecţiilor intestinale.

Sunt eliminate mai ales urinar, nemodificate, sunt nefrotoxice şi sunt utilizate în tratarea infecţiilor locale: otite externe, infecţii oculare şi tegumentare.

Gramicidina şi tirocidina sunt polipeptide naturale, active asupra bacteriilor Gram pozitive. Toxicitatea face ca utilizarea lor să fie doar locală. Acţiunea lor este de lezare a membranei citoplasmatice, în urma reacţiei cu fosfolipidele.

Nistatina, amfotericina B, antibiotice polienice, au acţiune antifungică şi sunt administrate oral sau local.

3.Antibiotice care inhibă sinteza proteică

Antibiotice cum ar fi tetraciclina şi aminoglicozidele inhibă sinteza proteinelor. După ce au pătruns în celulă şi au traversat membrana citoplasmatică, acestea se fixează pe ribosomi şi ca urmare pot inhiba sinteza proteinelor la nivelul mitocondriilor, opresc alungirea lanţurilor proteice, (formarea legăturilor peptidice între aminoacizi) se fixează pe fracţiunea ribosomală, determinând erori în citirea codului genetic, prin încorporarea unor acizi aminici necorespunzători şi sinteza unor proteine non sens, care genetic sunt letale (Fig.10.5).

Aminoglicozidele (aminozide – aminociclitoli) sunt constituite din unul sau mi multe cicluri glicozidice legate de un aminociclitol. Acţiunea lor este bactericidă asupra multor bacterii Gram negative şi Gram pozitive. Streptococii şi anaerobii sunt rezistenţi la aminoglicozide.

Aceste antibiotice inhibă sinteza proteinelor prin fixarea de ARNt la nivelul subunităţii de 30S (Tabel 10.1).

Streptomicina este utilizată în tratamentul tuberculozei şi a endocarditelor streptococice în asociere cu penicilina.

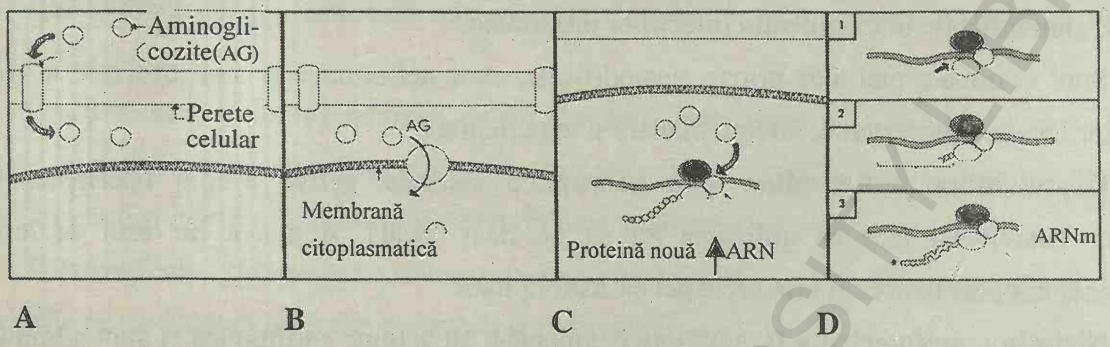
Neomicina, paromomicina, framicetina sunt utilizate numai pentru tratamente locale sau intestinale.

Gentamicina, tobramicina, netilmicina sunt utilizate în infecţiile sistemice cauzate de bacteriile Gram negativ sensibile, inclusiv *Enterobacteriaceae şi Pseudomonas*.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece modificările sub acțiunea enzimelor bacteriene sunt rare, *amikacina* este utilizată în tratarea infecțiilor cauzate de bacterii Gram negative rezistente la celelalte aminoglicozide.

Spectinomicina este utilizată în gonoreele cauzate de gonococii rezistenți la penicilină sau a pacienților alergici la penicilină.



1.Inhibarea sintezei ; 2. Inhibarea elongării; 3. Proteine modificate

Fig.10.5 Inhibarea sintezei proteice

A. Aminoglicozidul (AG) intră în celulă la nivelul porinelor

B. AG este transportat activ prin membrana citoplasmatică

C. AG se fixează pe subunitățile ribosomale 30S

D.In urma fixării au loc:1). Eşecul inițierii sintezei proteice; 2). Eşecul alungirii proteinelor; 3). Citirea greşită a ARNt duce la modificarea proteinelor.

Tabel 10.1 Aminoglicozide

Streptomicina	Tobramicina
Kanamicina	Amikacina
Gentamicina	Netilmicina
Neomicina	Sisomicina
Paromomicina	Spectinomicina
Framicetina	Dibekacina

Farmacocinetica. Deoarece aminoglicozidele sunt slab absorbite după administrarea orală, se administrează parenteral. Dozarea trebuie modificată în cazul pacienților cu funcția renală alterată, deoarece aminoglicozidele sunt excretate nemodificate prin filtrare glomerulară. Concentrațiile toxice ale aminoglicozidelor în sânge sunt apropiate de nivelurile necesare eificientei terapeutice.

Toxicitatea. Ototoxicitatea , ireversibilă, este un risc important în cazul insuficientei renale.

Macrolidele:

- Eritromicina
- Roxithromicina
- Spiramicina
- Midecamicina
- Josamicina

Acționează asupra bacteriilor Gram pozitive şi a cocilor Gram negativi. *Eritromicina* cu activitate bacteriostatică, este utilizată în tratarea infecțiilor pulmonare cazuate de *Mycoplasma* şi de microorganismele Gram pozitive, la pacienții alergici la ampicilină.

Lincosaminele: lincomicina, clindamicina sunt active asupra stafilococilor şi anaerobilor (*Bacteriodes spp.*)

Streptograminele: pristinamicina, virginiamicina sunt obținute prin asocierea a două molecule care acționează sinergic; active asupra stafilococilor.

Macrolidele, lincosaminele, şi streptograminele au spectru limitat şi acțiune de tip bacteriostatic. Inhibă sinteza proteică prin fixarea la nivelul ribosomilor de subunitatea 50S.

Farmacologie. În mod obişnuit se administrează pe cale orală; pătrund bine în țesuturi şi se elimină mai ales biliar.

Sunt bine tolerate şi dau uneori tulburări digestive minore sau alegrii cutanate. Clindamicina poate determina colita pseudomembranoasă la vârstnici, cu intervenții chirurgicale abdominale.

Tetraciclinele

Sunt antibiotice cu spectru larg, cu acțiune bacteriostatică asupra numeroaselor specii Gram pozitive şi negative, rickettsii, *Chlamydii*, mycoplasme. Mecanismul de acțiune constă în inhibarea sintezei proteinelor prin blocarea unităților 30S ale ribosomilor.

Din acest grup fac parte:

- Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, demetilclortetraciclina, rolitetraciclina, metaciclina;
- Doxiciclina;
- Minociclina.

Proprietăți farmacocinetice. *Tetraciclinele* se absorb rapid şi se elimină lent, ceea ce permite diminuarea posologiei şi spațierea prizelor (1 sau 2 /zi). Se administrează în mod obişnuit pe cale orală. Se elimină în parte netransformate, prin bilă şi urină. Realizează concentrații importante intracelulare, ceea ce permite utilizarea preferențială în infecții cauzate de microorganisme parazite intracelular, cum ar fi *Brucella* şi *Chlamydia*.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tetraciclinele au o bună distribuție în țesuturi, cu localizare mai ales în oase și dinți; nu se acumulează în lichidul cefalorahidian și nu sunt folosite în terapia meningitelor sau altor infecții ale sistemului nervos.

Toxicitatea: produc tulburări intestinale și colorarea în galben a dinților în momentul mineralizării dentare, fapt care contraindică utilizarea în cursul sarcinii și până la vârsta de 8 ani.

Cloramfenicolul ca și tiamfenicolul sunt produși obținuți acum prin sinteză; au spectru de acțiune larg, care includ numeroase bacterii aerobe și anaerobe. Cloramfenicolul este indicat preferențial în terapia febrei tifoide. Inhibă sinteza proteinelor prin legarea reversibilă de unitățile 50s ale ribosomilor. Se adminstrează oral sau parenteral. Pasajul prin meninge este bun; eliminarea este predominant urinară, în cea mai mare parte sub formă inactivă. Cloramfenicolul poate interveni în sinteza proteinelor în celulele măduvei osoase și duce la tulburări hematologice cum ar fi anemia aplastică (un caz la 24000 pacienți tratați).

Acidul fusidic are structură sterolică, cu acțiune asupra bacteriilor Gram pozitive (mai ales stafilococi) și a cocilor Gram negativi. Acționează prin inhibarea fazei de elongare a proteinelor. Se administrează pe cale orală și intravenoasă, cu o bună difuzie în țesuturi, dar nu și în *lcr.*; eliminarea este predominant biliară. Poate produce tulburări digestive. Mupirocina este produsă de *Pseudomonas fluorescens*. Mecanismul de acțiune este unic: inhibă izoleucin-ARNt sintetizează prin competiția cu izoleucina bacteriană pentru locul de legare pe enzimă și inhibă sinteza proteică.

4.Antibiotice care inhibă sinteza acizilor nucleici

Unii agenți antimicrobieni inhibă sinteza acizilor nucleici fie prin legarea de ARN – polimeraza (ex. rifampicina) fie prin inhibarea ADN – girazei (ex. quinolonele) (Fig.10.6).

Rifampicina este activă față de cocii Gram pozitivi și Gram negativi. Are acțiune asupra stafilicocilor. Se administrează parenteral și se elimină prin bilă. Prezintă toxicitate hepatică.

Rifampicina este activă asupra bacteriilor Gram pozitive, a cocilor Gram negativ și a unor bacili Gram negativi; unele enterobacterii, *Brucella, Legionella, Bacteriodes*. Este activă asupra *Mycobacterium tuberculosis*. Antibioticul se fixează pe ARN-polimeraza și blochează sinteza ARN mesager. Realizează concentrații bune în țesuturi și celule. În cursul tratamentului cu rifampicină poate apare icterul, cauzat de metaboliți instabili și toxici.

Quinolonele

Produșii mai vechi nu sunt activi asupra bacililor Gram negativi, difuzează slab în țesuturi și se elimină rapid prin urină (acid nalidixic, acid piromidic, acid oxolinic, acid pipemidic, flumequin).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sunt indicați în infecțiile urinare la adult per oral.

Produșii recenți – fluoroquinolonele – au spectru larg și farmacocinetica bună. Spectrul lor cuprinde enterobacteriile, *Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus, Neisseria.* Streptococii, *Bacteriodes*, sunt mai puțin sensibili.

Sunt disponibile: pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin (administrate i.v. sau oral), norfloxacin – administrat oral în infecțiile urinare.

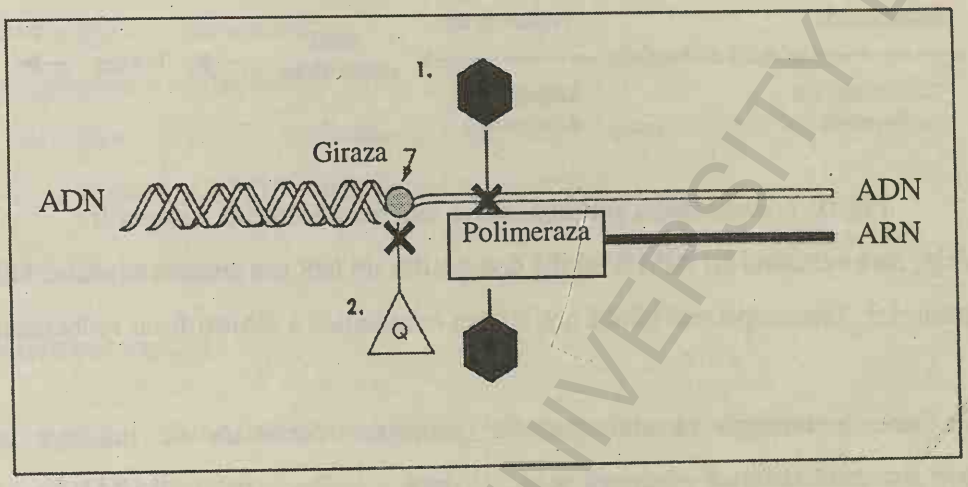


Fig.10.6 Inhibarea acizilor nucleici

1. Rifampicina (R) se leagă pe ARN-polimerază și inhibă sinteza ARN.
2. Quinolonele (Q) inhibă ADN-giraza și împiedică rularea ADN

Toxicitatea: quinolonele pot produce tulburări digestive, mialgii, artralgii.

Novobiocina inhibă replicarea ADN, împiedicând fixarea ATP pe ADN – giraza. Este bacteriostatică și are activitate bună asupra stafilococilor. Poate produce tulburări digestive, cutanate, hepatice, hematologice.

Nitro-imidazolii au spectrul limitat numai la bacteriile anaerobe; activitatea lor este posibilă prin reducerea grupării NO_2, realizată numai de bacteriile anaerobe. Acești produși se fixează pe ADN și produc ruperea legăturilor și derularea ADN; efectul este bactericid.

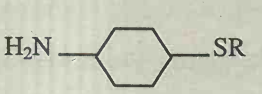
Metronidazolul, tinidazolul, ornidazolul se utilizează oral sau parenteral; au difuzie bună în țesuturi și meninge, cu eliminare urinară, în formă activă. Pot produce tulburări nervoase, leucopenie, hipotensiune când sunt adsorbite simultan cu alcoolul.

Nitrofuranii au spectru larg (dar inactivi asupra *Pseudomonas aeruginosa, Proteus, Serratia, Acinetobacter*). Realizează concentrații serice mici și se elimină rapid prin urină; se utilizează în tratarea infecțiilor urinare, per os (nitrofurantoin) sau intestinale (furazolidin, nifuroxazid, care nu se adsorb pe cale digestivă). Pot provoca reacții alergice și tulburări digestive.

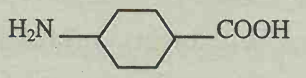
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.Antibiotice cu activitate antimetabolică

Numeroşi agenţi antimicrobieni acţionează ca antimetaboliţi.(Fig.10.7).



Sulfonamide



APAB (acid p – aminobenzoic)

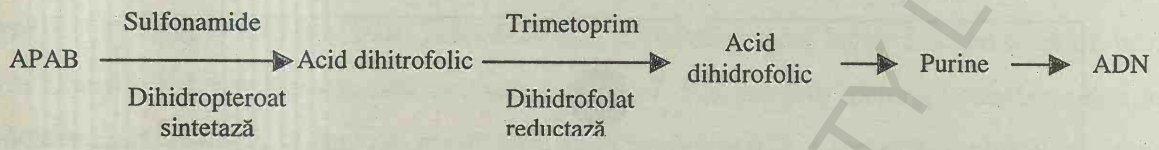


Fig.10.7 Activitatea antimetabolică sau metabolismul competitiv

Sufonamidele, care seamănă cu APAB inhibă competitiv un lanţ din sinteza acidului folic, necesar bacteriei; Trimetoprimul inhibă activitatea enzimatică a dihidrofolat reductazei

Sulfamidele acţionează ca antimetaboliţi printr-un mecanism de inhibare competitivă, deoarece au o structură chimică analoagă acidului para – amino – benzoic (PABA), care intră în molecula acidului folic. Folaţii au rol esenţial în metabolismul acizilor aminici, purinelor şi pirimidinelor şi prin aceasta intervin indirect în sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor. Prin inhibarea sintezei acidului folic, sulfamidele opresc multiplicarea bacteriilor (acţiune bacteriostatică). Deoarece celula mamiferelor nu sintetizează acid folic (care este furnizat prin hrană) sulfamidele nu interferă cu metabolismul acestor celule.

Sulfamidele, produşi de sinteză, administraţi pe cale orală, pot fi grupate în:

- *Sulfamide pentru infecţii generale*: sulfadiazin, sulfafurazol; se absorb repede în stomac şi intestin. Difuzează bine în ţesuturi şi mai ales în lichidul cefalorahidian; se elimină urinar.
- *Sulfamide "urinare":* sulfametoxazol, sulfametizol
- *Sulfamide intestinale*: sulfaguanidin, succinil – sulfatiazol, ftalil – sulfatiazol.

Teoretic spectrul lor este larg, dar anumite specii au rezistenţa naturală (*Enterococcus faecalis*, lactobacili); alte specii au dobândit rezistenţă la sulfamide.

Toxicitate: pot produce accidente renale, alergice, hematologice (leucopenie, anemie hemolitică) tulburări hepatice. Prescrierea lor este limitată din cauza efectelor secundare şi a rezistenţei numeroaselor tulpini.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diaminopirimidinele acționează prin inhibarea dihidrofolatreductazelor bacteriene. Au spectru larg, cu acțiune bacteriostatică, dar numeroase specii sunt natural rezistente. Trimetoprimul este cel mai utilizat.

Asociațiile sulfamide – diaminopirimidine sunt sinergice şi bactericide, au spectru larg (excepție *Pseudomonas aeruginosa* şi bacteriile anaerobe):

- trimetoprim + sulfametoxazol = cotrimoxazol;
- trimetoprim + sulfamoxol;
- trimetoprim + sulfametrol;
- trimetoprim + sulfadiazin.

Alte antifolice: *sulfonele*, utilizate în tratamentul leprei; acidul para – amino – salicilic (PAS) – analog structural al PABA, utilizat ca antituberculos.

Agenții antituberculoşi

Patru agenți constituie baza tratamentului în tuberculoză: izoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutolul.

Izoniazida (sau HIN – hidrazida acidului izonicotinic) inhibă sinteza acizilor micolici, constituienți esențiali ai peretelui mycobacteriilor, ca şi oxidarea NADH în NAD.

Are acțiune bactericidă asupra bacililor în faza de multiplicare activă şi a bacililor fagocitați de macrofage.

Rifampicina este activă asupra bacililor în faza de multiplicare, fagocitați sau extracelulari.

Pirazinamida are acțiune asemănătoare cu HIN dar nu este activă asupra bacililor fagocitați.

Etambutolul inhibă fixarea, la nivelul peretelui celular a acizilor micolici nou sintetizați. Este bacteriostatic asupra bacililor în multiplicare şi a celor fagocitați.

Etionamida şi prothionamida inhibă sinteza acizilor micolici.

Ansamicina – derivat de rifamicină a cărei acțiune asupra mycobacteriilor este încă studiată.

Mecanismele de rezistență ale bacteriilor la antibiotice

Pentru fiecare antibiotic este definit spectrul de activitate adică evantaiul speciilor bacteriene sensibile, susceptibile de a fi inhibate de concentrații de antibiotic care se obțin in vivo.

Rezistența naturală sau "intrinsecă" corespunde rezistenței tuturor tulpinilor care aparțin unei specii sau gen la acelaşi antibiotic (ex. *Enterococcus* este natural rezistent la lincomicină).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mecanismul acestei rezistenţe are suport genetic (cromosomal). Rezistența naturală face parte din patrimoniul genetic obişnuit al speciei.

Rezistența dobândită corespunde achiziționării rezistenței la un antibiotic de către o tulpină normal sensibilă. Această rezistență dobândită afectează populația fiecărei specii bacteriene cu o frecvență variabilă care depinde de presiunea de selecție exercitată de antibioticele utilizate în terapie.

Mecanismele rezistentei dobândite

Sub aspect bacteriologic o tulpină a devenit rezistentă dacă poate creşte în prezența unei concentrații de antibiotic mai mare decât concentrația care inhibă tulpinile normale, sensibile ale speciei.

Rezistența are suport genetic, cromosomal sau plasmidic. Un antibiotic poate să acționeze dacă pătrunde în celulă şi se menține în formă activă şi în cantitate suficientă în contact cu ținta sa.

Mecanismele de rezistență sunt multiple:

- Absența pătrunderii antibioticului prin diminuarea sau suprimarea permeabilității parietale sau membranare;
- Alterarea țintei moleculare de acțiune a antibioticului prin modificarea situsului de fixare sau degradarea enzimatică a țintei. În anumite cazuri ținta poate dispare sau este substituită;
- Ieşirea excesivă a antibioticului din bacterie, ceea ce determină realizarea unor concentrații insuficiente pentru a exercita acțiunea la nivelul țintei;
- Inactivarea enzimatică a antibioticului, fie prin hidroliză (sub acțiunea penicilinazelor, cefalosporinazelor (pentru beta-lactamine) fie prin modificarea structurii chimice (acetilaze, adenilaze, fosforilaze, pentru aminozide). Enzimele de inactivare sunt numeroase şi acționează asupra majorității antibioticelor

Mecanismele specifice ale rezistentei bacteriene față de majoritatea agenților antimicrobieni sunt incluse în Tabel 10.2.

Suportul genetic al rezistenței

Rezistența este asociată cu informația purtată de codul genetic al bacteriei, al cărui suport este cromosomul bacterian, o plasmidă sau elementele genetice transpozabile (transpozoni).

Rezistența se poate dobândi prin: a). mutație cromosomică; b). achiziție de informații prin transfer de gene (plasmide) de la o bacterie rezistentă la una sensibilă.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 10.2 Mecanismele rezistenței bacteriene față de principalii agenți antibacterieni

Agent antibacterian	Tinta principală de acțiune	Mecanism de acțiune	Mecanism de rezistență
Beta-lactamine (peniciline şi cefalosporine)	Peretele celular	Inhibarea legării încrucişate a peptidoglicanilor în perete celular	1.Inactivarea antibioticului sub acțiunea beta-lactamazelor 2.Modificarea țintei (modificarea PBP) 3.Permeabilitate diminuată (modificarea porinelor)
Vancomicina	Peretele celular	Interferarea cu procesul de adăugare de noi subunități în peretele celular	Modificarea țintei (substituirea aminoacidului terminal al subunității peptidoglicanului)
Bacitracina	Peretele celular	Previne adăugarea de subunități la peretele celular prin inhibarea transportului transmembranar lipidic	Neprecizat
Macrolide (eritromicină)	Sinteza proteică	Legarea de subunitatea ribosomală 50S	Modificarea țintei
Lincozamide (clindamicină)	Sinteza proteică	Legarea de subunitatea ribosomală 50S	Modificarea țintei
Cloramfenicol	Sinteza proteică	Legarea de subunitatea ribosomală 50S	Inactivarea antibioticului (acetiltransferaza)
Tetracicline	Sinteză proteică	Legarea de subunitatea ribosomală 30S	1.Diminuarea acumulării intracelulare a antibioticului (eflux activ) 2.Tintă modificată
Aminoglicozide (gentamicina)	Sinteza proteică	Legarea de subunitatea ribosomală 30S	Inactivarea enzimatică
Sulfonamide şi trimetoprim	Metabolism celular	Inhibarea competitivă a enzimelor implicate în sinteza acidului folic	Producerea de ținte insensibile: acid dihidropteroic (sulfonamide) şi acid dihidrofolic (trimetoprim)
Rifampicina	Sinteza ADN	Inhibă ARN - polimeraza	Tintă insensibilă (mutații ale genei polimerazei)
Quinolone	Sinteza ADN	Inhibă ADN-giraza (subunitatea A)	1.Tintă insensibilă (mutații ale genei polimerazei 2.Diminuarea acumulării intracelulare
Novobiocina	Sinteza ADN	Inhibă ADN-giraza (subunitatea B)	Neprecizat
Polimixine (polimixina B)	Membrana celulară	Modifică permeabilitatea membranei prin modificarea sarcinilor electrice de la suprafața acesteia	Neprecizat
Gramicidina	Membrana celulară	Formează pori	Neprecizat

BCU IASI - OPEN ACCESS LIBRARY

Rezistența prin mutație cromosomică

Acest tip de mutație nu afectează decât un număr mic de tulpini şi se caracterizează prin:

- spontaneitate: nu este indusă de un antibiotic;
- raritate: rata mutației este de $10^{-7} - 10^{-8}$;
- stabilitate: caracterul devine ereditar;
- specificitate: o mutație nu afectează decât un caracter.

Consecințe clinice. Indivizii rezistenți preexistă în populația sensibilă şi antibioticul acționează doar ca agent selector. Riscul apariției mutanților rezistenți poate fi evitat prin aplicarea terapiei în care se asociază două antibiotice din familii diferite. Pentru anumite grupe de bacterii, ex. mycobacteriile – acesta este singurul mecanism de rezistență observat.

Rezistența prin achiziția de gene

O bacterie inițial sensibilă achiziționează informație genetică sub formă de ADN plasmidic sau transposoni. Această informație permite expresia rezistenței la mai multe antibiotice. Plasmidele se pot transfera între bacterii îndepărtate taxonomic. Bacteriile care posedă aceste plasmide sunt "contagioase", deci rezistența devine epidemică.

Consecințe clinice. Rezistența plasmidică interesează numeroase antibiotice, cu excepția rifamicinelor, polimixinelor, nitrofuranilor şi probabil, vancomicina şi quinolonele, produşi pentru care se cunoaşte doar rezistența prin mutație.

Rezistența dobândită față de familiile de antibiotice

Rezistența față de beta-lactamine se manifestă prin patru mecanisme:

- alterarea porinelor cu diminuarea permeabilității (la bacilii Gram negativi);
- inactivarea enzimatică prin beta- lactamaze, care deschid nucleul beta – lactamic;
- modificarea țintelor, adică a PBP (rezistența stafilococilor la meticilină, rezistența pneumococilor la penicilină);
- creşterea concentrației minime bactericide (CMB) în raport cu concentrația minimă inhibitorie (CMI) dată de absența activării autolizinelor, fenomen numit "toleranță"; acest fenomen este prezent la streptococi față de beta-lactamine.

Rezistența la vancomicină este prezentă la enterococi şi stafilococi, alții decât *Staphylococcus aureus.*

Rezistența la aminoglicozide. Mutația poate afecta ținta moleculară ribosomală sau pătrunderea în celulă (în acest caz rezistența este încrucişată între numeroşi compuşi ai familiei).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezistența plasmidică prin sinteza de enzime de inactivare (acetilaze, fosforilaze, adenilaze), prezentă la bacteriile Gram negative şi Gram pozitive este cea mai răspândită. O singură enzimă poate inactiva aminoglicozide diferite.

Rezistența la tetracicline este plasmidică, tradusă printr-o excreție activă a antibioticului în afara celulei, cu o concentrare internă diminuată. Minociclina poate fi degradată de enterobacterii.

Rezistența la cloramfenicol este plasmidică, prin codificarea unei acetilaze care inactivează antibioticul.

Rezistența la macrolide, lincosamine, streptogramine, este frecvent plasmidică, prin producerea crescută de precursor (PAB) sau prin producerea de enzime (care intervin în sinteza precursorului) cu afinitate scăzută pentru antibiotic.

Rezistența la sulfamide şi trimetoprim are loc prin diminuarea permeabilității sau modificarea țintei. Suportul genetic este plasmidic sau cromosomal.

Rezistența la quinolone apare prin mutație, care determină sinteza de ADN girază mai puțin sensibilă la quinolone. ADN-giraza intervine în organizarea circulară şi superînrulată a ADN bacterian, iar blocajul acestei enzime (ținta quinolonelor) duce la alterareaz biosintezei acizilor ribonucleici.

Rezistența la rifamicine apare prin mutație, în urma modificării unei subunități a ARN – polimerazei.

Rezistența compusă pentru un antibiotic este dată de două mecanisme diferite: ex. asocierea impermeabilității cu inactivarea enzimatică şi poate explica rezistența față de cefalosporinele de generația a III-a la *Pseudomonas aeruginosa, Serratia, Enterobacter.*

Rezistența asociată între numeroase familii de antibiotice este prezentă la tulpinile de spital şi este asigurată printr-un singur mecanism (impermeabilitate) sau mai multe mecanisme independente, ca la stafilococii rezistenți la meticilină (producerea de penicilinaze, modificări ale PBP, inactivarea enzimatică a aminozidelor, mutații ribosomale care fac inactive macrolidele, lincosamidele, streptograminele).

Sunt şi situații când rezistența la un antibiotic favorizează acțiunea altui antibiotic (ex. gena *tet*, responsabilă de rezistența la tetraciclină, creşte permeabilitatea pentru aminozide la bacteriile Gram negative).

Consecintele practice ale rezistenței la antibiotice

Bacteriile au multiple posibilități de adaptare la condițiile de mediu în care intervine terapia cu antibiotice: pentru fiecare compus nou, bacteriile găsesc "contramăsuri" defensive.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Spectrul teoretic este valabil numai pentru speciile a căror sensibilitate rămâne stabilă. Pentru alte specii trebuie luate măsuri de limitare a răspândirii lor prin supravegherea epidemiologică, printr-o politică strictă de prescriere a antibioticelor asociate cu măsuri de igienă riguroase.

Metode de studiu a activității antibiotice

Antibioticele pot fi în principiu active asupra unor specii şi inactive asupra altora (rezistente natural). Alegerea terapiei cu antibiotice nu se poate face numai pe baza spectrului de activitate teoretic deoarece trebuie avute în vedere fenomenele rezistenței dobândite.

În cele mai multe situații, laboratorul orientează sau corectează prescripția şi pentru aceasta este necesară izolarea bacteriei infectante şi precizarea antibioticelor active in vitro asupra bacteriei în doze utilizabile in vivo.

Pentru *antibioticele care inhibă creşterea bacteriană* (efect bacteriostatic) se determină *concentrația minimă inhibitorie* şi se realizează *antibiograma* care oferă o primă apreciere a sensibilității bacteriilor la diferite familii de antibiotice.

Pentru *antibioticele care omoară bacteriile* (efect bactericid) se determină *concentrația minimă bactericidă* (CMB).

Relația bacterie – antibiotic

Relația bacterie – antibiotic in vitro este concretizată prin:

- concentrația minimă inhibitorie (CMI): cea mai mică concentrație de antibiotic care inhibă creşterea bacteriei testate;
- concentrația minimă bactericidă (CMB): cea mai mică concentrație de antibiotic care omoară 99,9% - 100% din populația bacteriană testată.

Relația bacterie – antibiotic in vivo este definită prin concentrația de antibiotic activ în focarul de infecție (factor major pentru succesul terapiei cu antibiotice) care depinde de:

- dozare (toxicitatea antibioticului este factor limitant);
- distribuție (condiționată de doza, calea de administrare, localizarea focarului infecțios, difuzia în țesuturi şi fluide, legarea de proteinele plasmatice);
- metabolizarea hepatică şi renală;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- calea de eliminare: urinară, biliară, digestivă şi procentul de eliminare sub formă nemodificată, activă.

Din punct de vedere al relației dintre CMI şi concentrația de antibiotic la locul infecției, bacteriile sunt considerate:

- *Sensibile*: dacă CMI este de minimum 2-4 ori mai mică decât nivelul obținut în focarele de infecție (fluide, țesuturi) cu doze terapeutice uzuale;
- *Rezistente*: dacă CMI este mai mare decât concentrațiile medii obținute de antibiotic în focarul de infecție. Antibioticul determină efecte toxice înainte de a atinge CMI;
- *Intermediare*: dacă CMI este apropiat de nivelul mediu al antibioticului în focarul de infecție. Efectul terapeutic se obține cu doze mari de antibiotic sau prin administrare locală.

În anumite fluide (mai ales în urină şi bilă) antibioticele realizează niveluri mult mai mari decât în sânge încât bacteriile care cauzează infecții limitate la nivelul căilor urinare, au *sensibilitate condiționată.*

Spectrul de sensibilitate la antibiotice al unei specii bacteriene include toate antibioticele față de care tulpinile testate sunt sensibile.

Spectrul antimicrobian al unui antibiotic cuprinde toate speciile cu toate tulpinile, sau aproape toate tulpinile sensibile la acest antibiotic.

Spectrul de sensibilitate al bacteriilor la antibiotice şi spectrul antibacterian se diferențiază în *spectru inițial* (natural) şi *spectru actual*, mai restrâns ca cel natural.

Antibioticul de rezervă este un antibiotic cu utilizare restrânsă doar la tratarea infecțiilor bacteriene grave şi în cazul tulpinilor găsite rezistente la antibioticele uzuale, după efectuarea antibiogramei.

Clasificarea antibioticelor în raport cu spectrul antimicrobian natural:

- Antibiotice antibacteriene

  a). active în principal sau exclusiv asupra bacteriilor Gram pozitive (spectru tip penicilină): peniciline, macrolide, lincomicina, bacitracina, vancomicina;

  b). active mai ales sau exclusiv asupra bacteriilor Gram negative (spectru tip streptomicină): aminoglicozide, clindamicina, polimixinele, acidul nalidixic;

  c). active asupra bacteriilor Gram pozitive şi Gram negative – cu spectru larg: peniciline de semisinteză, cefalosporine, carbapeneme, rifamicina, sulfamide, trimetoprim, fluoroquinolone;

  d). antituberculoase: izoniazida, rifampicina, streptomicina, etambutol, pirazinamida.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Antibiotice antifungice: derivaţi polienici (amfotericina B, Nistatina), de cumaronă, (griseofulvina, de fluoropirimidina (flucitozină); derivaţi imidazolici şi triazolici (ketoconazol, miconazol);
- Antibiotice antivirale: amine sintetice (amantadina, rimantadina), analogi purinici şi pirimidinici (idoxuridina), aciclovir, vidarabina, zidovudin, analogi ai nucleozidelor (ribavirin).

Antibiograma

Antibiograma se realizează prin cultivarea bacteriei de testat in vitro în condiţii standard (mediu de cultură, inoculum, timp de incubare, etc.) în prezenţa unor cantităţi descrescânde de antibiotic.

Scopul antibiogramei este de a determina concentraţia minimă inhibitoare a fiecărui antibiotic, care se exprimă în µg/ml sau mg/l.

Sunt două modalităţi de realizare a gradientului concentraţiilor de antibiotic faţă de care testăm sensibilitatea bacteriei metoda difuzimetrică şi metoda diluţiilor.

Principiile antibiogramei prin metoda difuzimetrică

- Discuri de hârtie impregnate cu o cantitate definită de antibiotic sunt depuse pe suprafaţa mediului agarizat, repartizat în plăci Petri, însămânţat cu suspensia bacteriei de testat în faza exponenţială a creşterii. Concentraţia de antibiotic din discuri este apropiată de concentraţiile obţinute în ser.
- Din disc, antibioticul difuzează în geloză, concentraţia sa scăzând pe măsură ce se îndepărtează de sursă (gradient de concentraţie).
- După incubare (18 ore la 37^0 C) fiecare disc este înconjurat de o zonă de inhibiţie a creşterii bacteriene; multiplicarea bacteriei se opreşte acolo unde în geloză se realizează o concentraţie de antibiotic egală cu CMI.
- Funcţie de dimensiunea diametrului zonei de inhibiţie, se poate deduce valoarea aproximativă a CMI.

Rezultatele sunt exprimate ca Sensibil (S), intermediar (I), Rezistent (R) interpretate în raport cu valorile prestabilite, fie conform diametrelor de inhibiţie sau diametrelor critice (D, d) fie conform concentraţiilor de antibiotic sau concentraţiilor critice, (c, C) (Tabel 10.3; Tabel 10. 4).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 10.3 Clasificarea bacteriilor funcție de diametrul zonei de inhibiție

Interpretarea:

CMI ≤ c	tulpină S	Diametrul ≥ D	tulpină S
CMI > C	tulpină R	Diametrul < d	tulpină R
CMI > c şi ≤ C	tulpină I	Diametrul ≥ d şi < D	tulpină I

Tabel 10.4 Standard de interpretare a diametrelor zonelor de inhibiție (antibiograma difuzimetrică) conform National Committee for Clinical Standards (NCCLS) 1991

Agent antimicrobian	Conținutul discului	Diametrul zonei de inhibiție (mm) Rezistent	Intermediar	Sensibil
Ampicilină	10µg			
Pentru: Gram negativi		<=13	-	14-16
stafilococi		<=28	-	-
enterococi		<=16	-	>=17
streptococi		<=21	-	22-29
Listeria monocytogenes		<=19	-	-
Azilocilin pentru *Pseudomonas*	75µg	<=17	-	>=28
Carbenicilina pentru:	100µg			
Pseudomonas		<=13	14-16	>=17
Alți Gram-negativi		<=19	20-22	>=23
Meticilina	5µg			
pentru stafilococi		<=9	10-13	>=14
Mezlocilina	75µg			
pentru: *Pseudomonas*		<=15	-	>=16
Alți Gram-negativi		<=17	-	>=21
Nafcilina pentru stafilococi	1µg	<=10	11-12	>=13
Oxacilina pentru:	1µg			
stafilococi		<=10	11-2	>=13
pneumococi		<=19	-	>=20
bacterii sensibile la penicilina G				
Penicilina G pentru:	10 unități	<=28	-	>=29
stafilococi		<=14	>=15	-
enterococi		<=19	20-27	>=28
streptococi		<=19	-	>=20
L. monocytogenes				
Piperacilina pentru:	100µg	<=17	-	>=18
Pseudomonas		<=17	18-20	>=21
Alte bacterii Gram-negative				
Ticarcilina pentru:	75µg	<=14	-	>=15
Pseudomonas		<=14	15-19	>=20
Alte bacterii Gram-negative				
Combinații beta-lactam/inhibitor de beta-lactamază				
Amoxicilină/acid clavulanic pentru:	20/10µg	<=19	-	>=20
stafilococi		<=13	14-17	>=18
alte specii	10/10µg	<=11	12-14	>=15
Ampicilină/sulbactam	75/10µg			
Ticarcilină/acid clavulanic pentru:		<=14	-	>=15
Pseudomonas		<=14	15-19	>=20
alte specii Gram-negative				

BCU TG / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Agent antimicrobian	Conținutul discului	Diametrul zonei de inhibiție (mm) Rezistent	Intermediar	Sensibil
Cefalosporine și alte cefeme				
Cefaclor	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefamandol	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefazolin	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefixim	5µg	<=15	16-18	>=19
Cefonicid	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefoperazona	75µg	<=15	16-20	>=21
Cefotaxim	30µg	<=14	15-22	>=23
Cefotetan	30µg	<=12	13-15	>=16
Cefoxitin	30µg	<=14	15-17	>=18
Ceftazidim	30µg	<=14	15-17	>=18
Ceftizoxim	30µg	<=13	15-22	>=23
Ceftriaxona	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefuroxim axetil (oral)	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefuroxim sodium (parenteral)	30µg	<=14	15-17	>=18
Cefalotina	30µg	<=14	15-17	>=18
Moxalactam	30µg	<=14		>=18
Glicopeptide				
Teicoplanin pentru:	30µg			
enterococi		<=10	11-13	-
alte specii Gram-pozitive		<=10	11-13	>=14
Vancomicină pentru:	30µg			
enterococi		<=14	15-16	>=17
alte specii Gram-pozitive		<=9	10-11	-
Aminoglicozide				
Amikacina	30µg	<=14	15-16	>=17
Gentamicina	10µg	<=12	13-14	>=15
Kanamicina	30µg	<=13	14-17	>=18
Netilmicina	30µg	<=12	13-14	>=15
Streptomicina	10µg	<=11	12-14	>=15
Tobramicina	10µg	<=12	13-14	>=15
Macrolide				
Eritromicina	15µg	<13	14-22	>23
Tetracicline				
Doxiciclina	30µg	<12	13-15	>16
Minociclina	30µg	<14	15-18	>19
Tetraciclina	30µg	<14	15-18	>19
Quinolone				
Cinoxacin	100µg	<=14	15-18	>19
Ciprofloxacin	5µg	<=15	16-20	>21
Enoxacin	10µg	<=14	15-17	>18
Acid nalidixic	30µg	<=13	14-18	>19
Norfloxacin	10µg	<=12	13-16	>17
Ofloxacin	5µg	<=12	13-15	>16
Temafloxacin	5µg	<=12	13-15	>16
Alți agenți				
Cloramfenicol	30µg	<=12	13-17	>18
Clindamicina	2µg	<=14	15-20	>21
Nitrofurantoin	300µg	<=14	15-16	>17
Rifampicin	5µg	<=16	17-19	>20
Sulfonamide	250 sau 300µg	<=12	13-16	>=17
Trimetoprim	5µg	<=10	11-15	>16
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	<=10	11-15	>=16

UMF IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modalităţi practice de realizare a antibiogramei prin difuzia în geloză

În placa Petri, cu fund perfect plan se toarnă geloza Mueller-Hinton, în strat gros de 4mm. Plăcile se usucă înainte de utilizare.

Inoculul bacterian se obţine plecând de la bacteria izolată în cultură pură, în faza logaritmică, standardizată nefelometric: 10^8 UFC/ml (unităţi formatoare de colonii).

Însămânţarea se face prin inundare/aspirare, sau cu un tampon de vată, steril netoxic, care se scufundă în suspensie, se îndepărtează excesul prin presare de pereţii tubului şi se trece pe suprafaţa mediului, în trei direcţii pentru a se obţine un inoculum uniform.

Plăcile se ţin 15 minute la 37^0 C pentru a facilita absorbţia inoculului în geloză.

Discurile se aplică cu un dispenser sau cu pensa, la distanţa de 3cm între ele şi 1,5cm de marginea plăcii. Plăcile se lasă 30 minute la temperatura camerei pentru predifuzie, după care se incubează, 18 ore la 37^0 C, cu capacul în jos (pentru a evita curgerea condensului).

Controlul testării se face cu tulpini de colecţie, care îşi păstrează nemodificată sensibilitatea naturală la antibiotice: *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, pentru testarea bacteriilor Gram pozitive şi *Escherichia coli ATCC 25922* pentru bacteriile Gram negative.

Este posibil ca în zona de inhibiţie să apară colonii şi identificarea acestora trebuie să precizeze dacă sunt contaminaţi sau mutanţi rezistenţi.

Antibiograma prin metoda diluţiilor

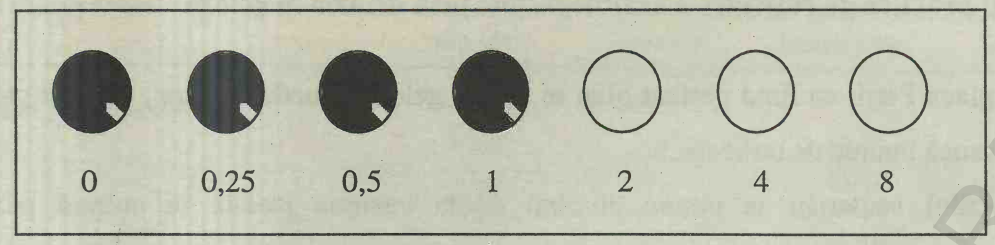
1. Diluţiile în mediu lichid. Determinarea CMI

Bacteria izolată din infecţii care pun în pericol viaţa pacientului (septicemii, endocardite subacute, meningite) este testată faţă de 3 – 4 diluţii de antibiotic care acoperă gama de concentraţii serice sau din focarul infecţios, obţinute prin posologia uzuală. Diluţiile se prepară în bulion Mueller – Hinton.

În tuburi sunt distribuite în volume identice, concentraţii duble de antibiotic; fiecare tub este apoi inoculat cu aceeaşi cantitate de suspensie, care nu produce nici o tulburare vizibilă. Un alt tub inoculat, dar fără antibiotic va servi drept martor. După incubare la 37^0 C, 18 ore, se examinează tuburile: în tubul martor ca şi în cele în care concentraţia de antibiotic este prea mică, bacteria se multuplică şi tulbură vizibil mediul.

Pornind de la o anumită concentraţie de antibiotic mediul rămâne limpede.Primul tub în care nu există creştere vizibilă indică *concentraţia minimă inhibitorie* a antibioticului testat (Fig.10.8).

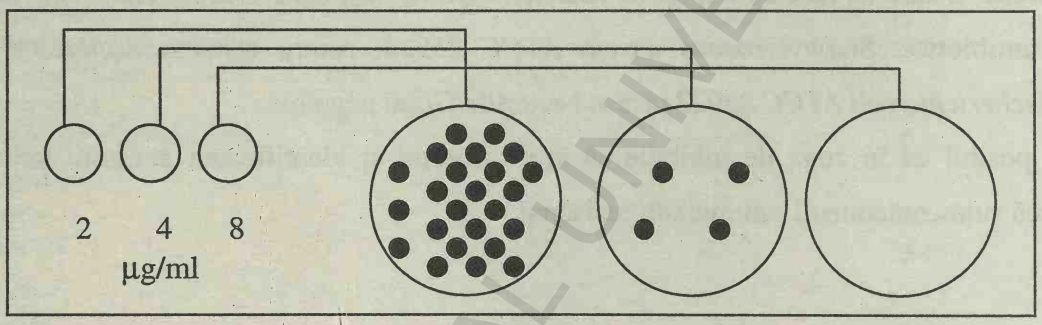
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



μg/ml antibiotic

Fig.10.8 Determinarea CMI prin diluții în mediu lichid. În acest caz, CMI = 2 μg/ml.

Determinarea CMB se face în cazul izolatelor din septicemii şi endocardite subacute. Din tuburile în care creşterea nu este vizibilă se inoculează 0,1ml în plăci cu geloză nutritivă şi se numără coloniile (Fig.10.9). CMB este dată de concentrația cea mai mică de antibiotic care omoară 99,9% din bacteriile prezente în inoculum.



24 colonii (>0,1% din nr.

4 colonii (<0,1% din nr.

Fig.10.9 Stabilirea CMB

2. Diluțiile în mediu agarizat Mueller – Hinton

Există posibilitatea de a inocula în spoturi suprafața mediului agarizat care conține diluții duble crescătoare ale antibioticului studiat, cu ansa calibrată sau cu un dispozitiv care aplică simultan un anumit număr de spoturi (*Steers aparatus*).

CMI este determinat de cea mai mică concentrație la care creşterea vizibilă este absentă (Fig.10.10).

Sub aspect farmacologic, concentrația de antibiotic obținută în sânge sau în focarul infecțios, în cursul tratamentului este sau nu suficientă pentru a inhiba bacteria izolată. Ca regulă generală, clinicianul are interesul de a utiliza antibiotice a căror CMI este cât mai mic posibil în raport cu concentrația critică care determină sensibilitatea. Acest raport trebuie să fie cât mai ridicat posibil.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

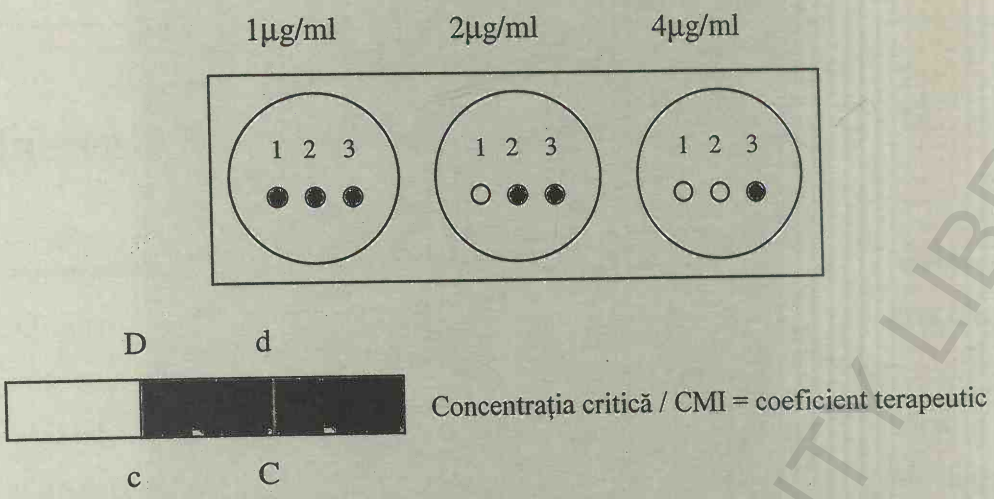


Fig.10.10 Determinarea CMI prin diluții în agar Mueller-Hinton: tulpina 1 are CMI=2µg/ml

Evidențierea producerii de beta-lactamaze

Producerea de beta-lactamaze poate fi evidențiată prin:

a. Testul idometric. Principiu: iodul şi amidonul reacționează în soluție şi dau culoarea albastră; acidul peniciloic format din penicilină sub acțiunea beta-lactamazei reacționează cu iodul şi-l face indisponibil pentru reacția cu amidonul. Decolorarea complexului iod-amidon indică prezența enzimei.

Tehnica: pe o lamă de microscop se depune o picătură din soluția penicilină + iod în care, cu ansa se face o suspensie din bacteria de testat. Decolorarea suspensiei sau apariția de arii incolore în jurul agregatelor bacteriene, în timp de 5 minute, indică un test pozitiv.

b. Testul cromogenic (testul cu nitrocefin, cefalosporină cromogenă) pentru germenii la care beta-lactamazele difuzează în exterior: stafilococii, *Haemophilus*, gonococi.

c. Testul de sinergie cu amoxicilina-acid clavulanic, pentru bacteriile la care beta-lactamazele nu difuzează în exterior (testul dublului disc). Acest test se bazează pe sinergismul dintre inhibitorul de beta-lactamază, acidul clavulanic şi alte beta-lactamine.(Fig.10.11).

Discul cu amoxicilină-acidul clavulanic se plasează în centrul plăcii inoculate cu tulpina de testat iar în jur, la distanțe egale, se plasează 4 discuri cu celelalte beta-lactamine. Dacă este prezentă, beta-lactamaza este inhibată şi zona de inhibiție se lărgeşte în dreptul discului care conține şi acid clavulanic, având aspect de "dop de şampanie".

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

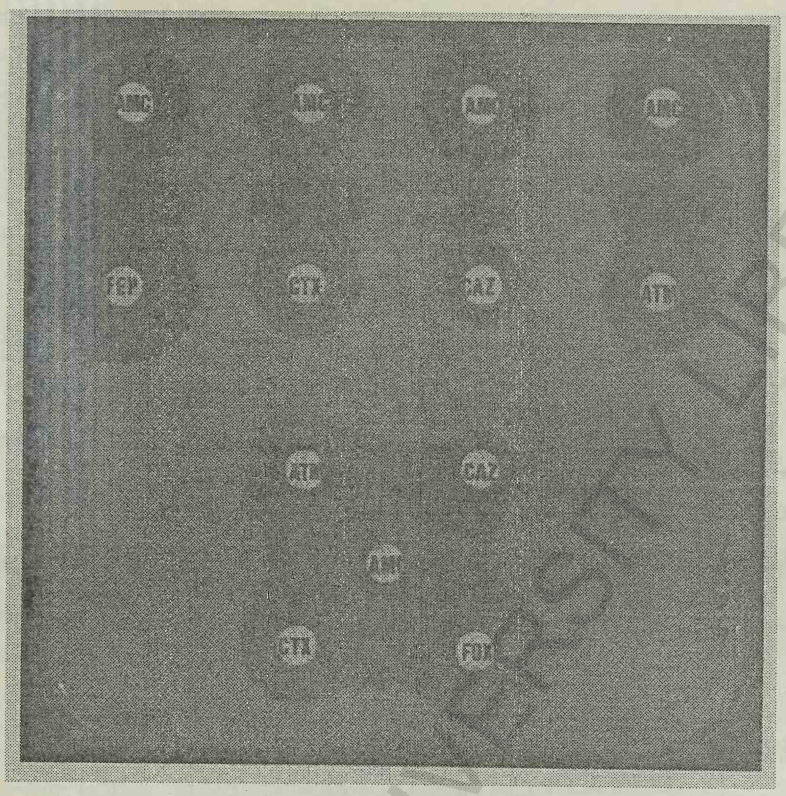


Fig.10.11 Testul pentru beta-lactamaze cu spectru larg

Bibliografie

Dever AD, Dermody TS. *Les mecanismes de resistence bacterienne aux antibiotiques.* JAMA, 3,26:659-673, 1991.

National Committee for Clinical Laboratory, Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically.* Approved Standard M7-A2, Vilanova, 1991.

Wingard LB, Brody TM., Larner J, Schwartz A. *Human Pharmacology*, 613-717.

Angelescu M. *Terapia cu antibiotice.* Editura Medicală 101-149, 1998.

Sirot J. *Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disk diffusion.* Clin Microbial Infect, 2, suppl 1, 535-539, 1996.

Thrupp LD. *Susceptibility testing of Antibiotics in liquid media.* In: Antibiotics in laboratory Medicine, Ed. Lorian V, Williams and Wilkins Baltimore. 73-105, 1981.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11

Obținerea antibioticelor

O mare parte din antibiotice se obțin prin fermentație. Peste 70% din antibioticele descoperite sunt produse de microorganisme, mai ales de actinomicete.

Primul antibiotic, penicilina, descoperit în 1929 de Alexander Fleming, a fost extras și purificat un deceniu mai târziu de către Florey și Chain; în timpul celui de-al doilea război mondial , penicilina era deja utilizată în terapie. Waksman și colaboratorii săi au obținut în 1943 streptomicina din *Streptomyces griseus*, utilizată în tratarea tuberculozei. In 1949 din *Streptomyces fradiae* se obține neomicina și 8 ani mai târziu, cercetătorii japonezi izolează kanamicina.

Multe din antibioticele introduse în terapie sunt cefalosporine. In 1945, Giuseppe Brotzu, izolează în Sardinia, un alt microorganism producător de antibiotic – *Cephalosporium acremonium* din al cărui lichid de cultură, Edward Abraham izolează cefalosporina C. Pornind de la acest compus de bază, pe parcurs s-au obținut alți derivați cu importanță clinică.

Producerea benzilpenicilinei

Obținerea penicilinei reprezintă un model pentru procesul de producție a antibioticelor.

Optimizarea proceselor de fermentație a constituit un factor semnificativ în dezvoltarea biotehnologiei moderne.

Microorganismul producător

Florey a obținut inițial penicilina cu *Penicillium notatum*. Izolarea unui alt producător, *Penicillium chrysogenum*, obținut de pe un pepene galben contaminat, în Ilinois, S.U.A., a fost un succes. Microorganismul trebuie cultivat submers în vase închise, în condiții de aerare.

Acest fung a fost supus de către fiecare producător, unor tratamente mutagene în scopul selectării de mutante înalt productive.

Tulpinile de producție sunt menținute în stare latentă prin tehnici standard de conservare. Astfel suspensia de spori este amestecată cu un suport steril și supusă desicării. Alternativ,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

suspensia de spori, în mediu adecvat, poate fi liofilizată. Toate operațiunile se desfăşoară în boxa cu aer laminar. Operatorii au îmbrăcăminte sterilă şi lucrează aseptic. Fermentația antibioticului necesită cultivarea în condiții aseptice, fără riscul contaminării cu alte microorganisme.

Prepararea inoculului

În scop industrial este necesară obținerea unui inocul pur, în volum suficient, în faza de creştere logaritmică, încât densitatea populației să fie mare.

În fig.11.1 este reprezentată calea tipică de obținere a inoculului. Timpul necesar fiecărei etape se măsoară în zile şi descreşte pe măsură ce secvențele progresează. Volumul final al inoculului este de 1-10% din capacitatea fermentatorului. Dacă fermentatorul este inoculat cu o cantitate insuficientă, se extinde faza de lag, înainte de a începe fermentația, a cărei durată se prelungeşte.

Mediul pentru stadiul de inoculum conține toți nutrienții necesari microorganismului; oxigenul, în cantități măsurate, se administrează sub formă de aer steril, iar temperatura este controlată şi menținută la valoarea optimă.

Microorganismul creşte sub formă de filamente ramificate (hife) şi pe măsură ce cultura progresează spre stadiul de producție capătă consistența unei supe.

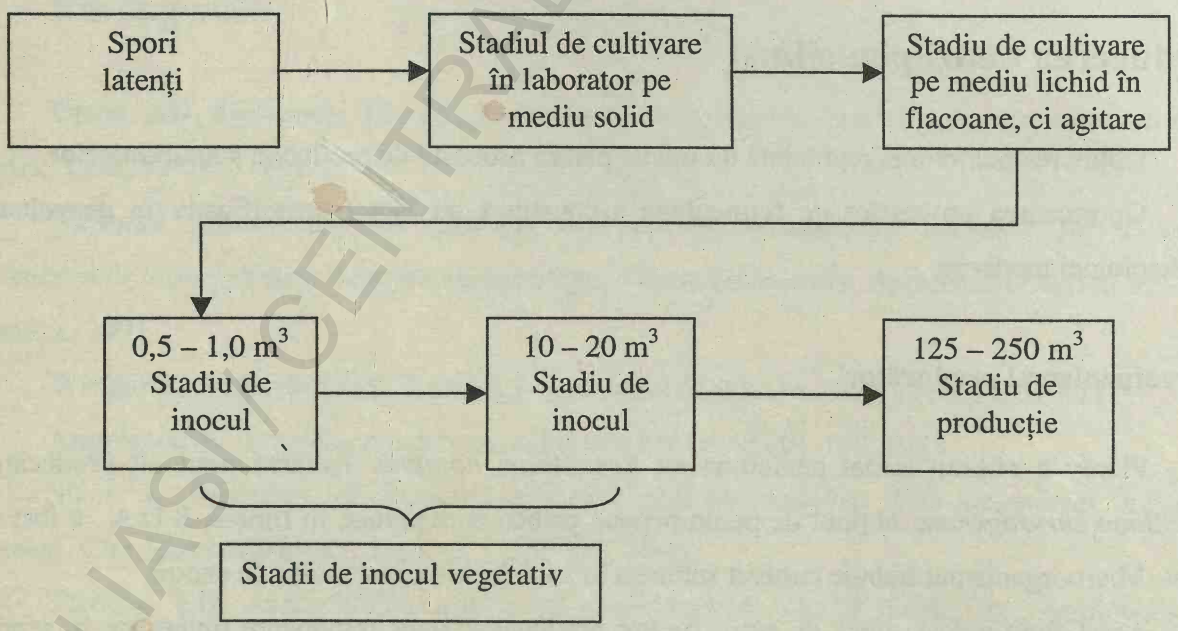


Fig.11.1 Stadii în prepararea inoculului pentru obținerea penicilinei prin fermentație.

Transferul în următorul stadiu se face în condiții care să prevină contaminarea

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fermentația

Un fermentator tipic este vertical, cilindric, din oțel inoxidabil, închis cu capac convex și cu capacitatea de 25-250 m^3. Înălțimea este de 2-3 ori diametrul. În fig.11.2 este prezentat schematic un vas de fermentație.

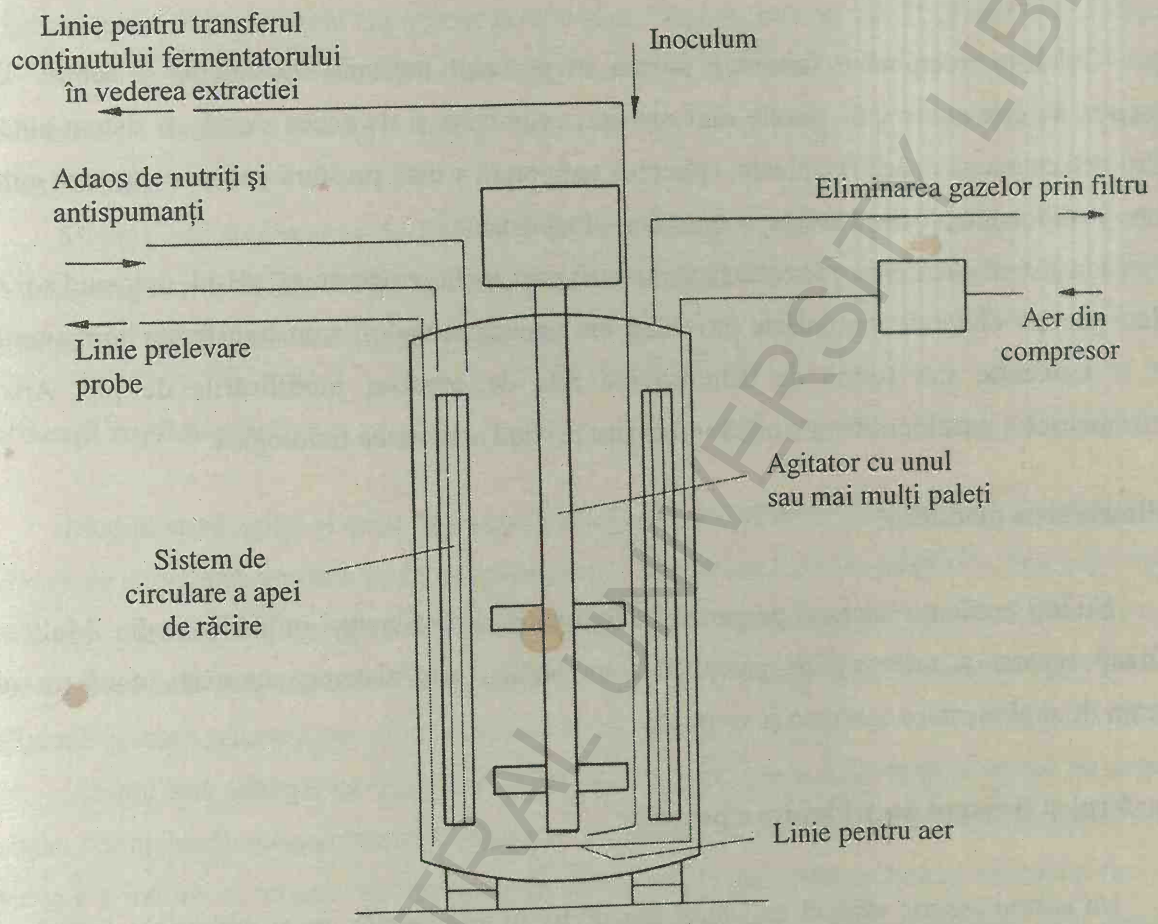


Fig.11.2 Schema generală a unui fermentator

Asigurarea oxigenului

În procesul de biosinteză a penicilinei este necesar oxigen trimis de la compresor prin filtre de sterilizare a aerului. Oxigenul este puțin solubil în apă și urmează întâi solvirea în faza lichidă și din soluția apoasă intră în celula microorganismului. Oxigenul este distribuit în mediul de cultură prin rotirea unui ax cu paleți, acționat de un motor.

Controlul temperaturii

Producerea de penicilină este foarte sensibilă la temperatură. Numeroase procese metabolice generează căldură și temperatura de fermentație trebuie redusă prin răcire controlată. Transferul de

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

căldură este asigurat prin circulația apei de răcire printr-un sistem de țevi amplasat în vas sau prin serpentinele din mantaua vasului de fermentație. Acest sistem de răcire cu apă este folosit și pentru răcirea mediului sterilizat în fermentator, înainte de a fi inoculat.

Agenții antispumanți

Culturile microbiene formează spumă în procesul mecanic de agitare și aerare. Dacă spumarea nu este controlată, gazele sunt mai greu eliminate și de aceea există un sistem automat pentru detectarea spumării incipiente, aplicarea temporară a unei presiuni pentru coborârea culturii în vas și adiționarea, în mod aseptic a agenților antispumanți.

Un sistem electronic controlează parametrii principali: temperatura, pH-ul, oxigenul solvit și analiza gazelor eliberate. Semnalele provenite din analiza probelor, sunt transferate computerului, care le transmite sub formă de date privind rata de creștere, modificările de pH. Analiza spectrometrică a gazelor eliberate oferă informații privind activitatea fiziologică.

Suplimentarea mediului

Nu toți nutrienții necesari pe parcursul fermentației sunt incluși inițial în mediu. Mulți sunt sterilizați separat și adăugați pe parcursul fermentației, prin sisteme automate, conform unui program de suplimentare continuă și aseptică.

Transferul și sistemul de prelevare a probelor

Un sistem aseptic asigură transferul inoculului în fermentator, ca și prelevarea probelor de rutină pe parcursul fermentației. Prelevarea probelor este esențială pentru monitorizarea creșterii, a concentrației de nutrienți și penicilină.

Controlul fermentației

Când cantitatea de oxigen a scăzut sub nivelul critic, biosinteza penicilinei se reduce, deși creșterea culturii continuă. Astfel, dacă în fermentator continuă creșterea într-un ritm care-l depășește pe cel din faza de inocul, cultura începe să devină foarte densă și aerația nu este suficientă pentru a menține producerea de penicilină. Ca urmare, condițiile trebuie ajustate astfel încât creșterea să asigure numai populația de celule care poate fi suportată de fermentator. Creșterea excesivă poate fi limitată prin nivelul nutrienților (în practică, a zaharurilor). Celulele pot fi stimulate în sensul "superproducerii" de penicilină, când creșterea este stabilă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Compoziția mediului

Mediul transferat în fermenator este complet. Ca sursa principală de azot se foloseşte extractul lichid din cereale, obținut în industria de producere a amidonului. Această materie primă este utilizată şi pentru mediile de cultură ale altor fungi. Extractul mai conține şi o serie de compuşi de carbon (acizi, zaharuri) ioni anorganici şi factori de creştere; este un mediu complex de creştere.

Derivat din produse naturale, care diferă între ele sub aspectul compoziției, acest complex este o sursă de variație şi una din cerințele biosintezei este ca procesul de fermentație să decurgă în condiții identice.

Mediul este suplimentat cu alți nutrienți esențiali, cum ar fi calciul, adăugat sub formă de carbonat, magneziu, sulfați, fosfați, potasiu şi cantități foarte mici de metale. Mediul este sterilizat cu vapori sub presiune, la 120^0C, în fermentator.

Nutrienții suplimentari

Mediul steril agitat şi aerat cu temperatura şi pH-ul controlate este inoculat. Sursa inițială de carbon este suficientă pentru a menține creşterea inițială dar nu şi pentru obținerea energiei necesare producerii penicilinei şi menținerea populației de celule pe durata fermentației. Carbonul pentru următoarele stadii este adăugat continuu astfel încât să limiteze creşterea excesivă a biomasei. Se utilizează sucroza, glucoza sau chiar amidonul hidrolizat.

Azotul este adăugat de obicei sub formă de amoniac gazos. Carbonul şi azotul nu numai că satisfac cerințele microorganismului, dar aceste elemente, într-o proporție corectă mențin o rezervă adecvată a ionilor de amoniu şi contribuie la controlul pH-ului. Metabolismul hidraților de carbon acidifică mediul şi amoniul menține balanța spre alcalinitate. Toate adaosurile sunt sterilizate înainte de a fi introduse în fermentator.

Contaminanții rezistenți la antibiotice ajung rar în fermentator, dar prezența lor are efecte negative: bacteriile contaminate, producătoare de beta-lactamază distrug penicilina, dar consumă şi nutrienții, determinând modificarea pH-ului. De asemenea interferă cu procesele ulterioare de extracție.

Faza de creştere trece rapid în faza de producere a antibioticului; valorile de pH şi temperatură, optime pentru creştere nu sunt eficiente şi pentru producerea de penicilină şi ca urmare aceşti parametri trebuie modificați şi controlați. Un alt factor care marchează începutul fazei de producție este adiționarea de acid fenilacetic. Acidul fenilacetic furnizează lanțurile secundare ale penicilinei; în absența acestuia se sintetizează doar cantități mici de penicilină. Concentrațiile mari de acid fenilacetic sunt toxice pentru microorganism şi de aceea adăugarea lui ca precursor nu se face în exces.

BUASM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Extracția

La sfârşitul fermentației, penicilina este prezentă în mediu, împreună cu alți metaboliți şi compuşi din mediu. Prima etapă constă în filtrarea lichidului de cultură sau centrifugarea lui pentru îndepărtarea resturilor de celule. Procesul are loc în condiții care previn contaminarea cu microorganisme producătoare de beta-lactamaze; acestea ar putea reduce considerabil cantitatea de penicilină.

Izolarea antibioticului

Izolarea penicilinei se face prin extracție cu solvent sau cromatografic, pe răşini cu schimbători de ioni şi precipitare. Extracția se face rapid deoarece penicilina este foarte instabilă la valori mici ale pH-ului.

Tratamentul extractului brut

Penicilina este produsă ca săruri ale diverselor elemente, funcție de modul în care va fi utilizată pentru folosirea clinică sau pentru obținerea antibioticelor beta-lactamice de semisinteză.

Tratamentul extractului brut diferă după scopul urmărit dar totdeauna este urmat de procedee de depirogenare şi sterilizare. Sterilizarea se realizează prin filtrare.

Pentru uz parenteral, antibioticul este repartizat în flacoane sterile, sub formă de pulbere.

Testele de control sunt efectuate pe un număr randomizat de probe, din produsul finit, pentru a urmări puritatea, activitatea, prezența pirogenelor şi sterilitatea.

Toate etapele producerii antibioticului, de la fermentație la produsul finit sunt conduse conform codului practicii bune de fabricatie, în care controlul de calitate este un aspect esențial.

Codul practicii bune de producție (*Good manufacturing practice, GMP*) cere ca sistemul de producție să fie planificat, documentat, implementat, controlat şi dotat cu personal, echipament şi alte resurse care să asigure obținerea de produse calitativ adecvate scopului în care sunt utilizate.

Bibliografie

Queener SW. *Molecular biology of penicillin and cephalosporin biosynthesis*. Antimicrob Agents Chemother, 34: 943-948, 1990.

Rohm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler P (eds). *Biotechnology*, v 3, *Bioprocessing*. New York: VCH, 1993.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12

Utilizarea clinică a agenților antimicrobieni

Avantajele utilizării unei terapii eficiente sunt evidente, dar se mai pune şi problema utilizării adecvate a agenților antimicrobieni. Un studiu privind utilizarea antibioticelor a arătat că peste 50% din prescripții sunt inadecvate. Aceasta demonstrează că antibioticele sunt administrate în situații când sunt ineficiente, cum ar fi infecții virale, sau când agentul selectat, doza, calea de administrare sau durata utilizării sunt necorespunzătoare. Un aspect particular îl oferă utilizarea prelungită a antibioticelor în profilaxia chirurgicală care sporeşte riscul suprainfecțiilor cu microorgansime rezistente sau apariția reacțiilor adverse.

Utilizarea clinică a agenților antimicrobieni trebuie să se bazeze pe principii care să asigure eficiența şi siguranța în administrare a agenților antimicrobieni.

Principiile chemoterapiei antimicrobiene

Sensibilitatea microorganismului infectant

Selectarea unui agent antimicrobian trebuie făcută pe baza cunoaşterii activității sale asupra organismului infectant.

Sensibilitatea microorganismului la un anumit agent poate fi deja cunoscută şi atunci nu mai sunt necesare testele de laborator (ex. *Streptococcus pyogenes* este constant sensibil la penicilină); sensibilitatea multor specii Gram-negative este mai puțin previzibilă şi atunci sunt necesare, indicațiile laboratorului, pentru a face o alegere corectă a antibioticului.

În Tabelul 12.1 este prezentată sensibilitatea unor bacterii frecvent implicate în infecții, la agenții antimicrobieni.

Este cunoscut că deşi in vitro unele bacterii sunt sensibile la un anumit agent, utilizarea acestuia poate fi inadecvată, datorită proprietăților farmacologice sau este preferat un alt agent mai puțin toxic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 12.1 Sensibilitatea unor bacterii la agenți antimicrobieni utilizați frecvent

	Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus pyogenes* și *S. pneumoniae*	*Enterococcus*	*Cl. perfringens*	*Neisseria gonorrhoeae*	*Neisseria meningitidis*	*Haemophilus influenzae*	*Escherichia coli*	*Klebsiella spp.*	*Proteus spp.*	*Proteus spp.*	*Serratia spp.*	*Salmonella spp.*	*Shigella spp.*	*Pseudomonas spp.*	*Bacteroides fragilis*	*Bacteroides spp.*	*Chlamidya spp.*	*Mycoplasma pneumoniae*	*Rikettsia spp.*
Penicilină	+	R	+*	+	+	+*	+	±	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	R
Meticilină, flucloxacină	+	+*	+	R	(+)	(±)	(±)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(±)	R	R	R
Ampicilină, amoxicilină	+	R	+*	+	+	+*	+	±	±	R	+	R	R	±	±	R	R	+	R	R	R
Ticarcilină	(+)	R	(+)	R	+	(+)	(+)	(+)	±	±	+	±	±	(+)	(+)	+*	±	±	R	R	R
Cefazolin	+	+*	+	R	(±)	(+)	(+)	±	+	±	+	R	R	(+)	(+)	R	R	±	R	R	R
Cefamandol, Cefuroxim	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	R	(+)	(+)	R	R	R	R	R	R
Cefoxitin	+	+	+	R	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	±	(+)	(+)	R	+	+	R	R	R
Cefotaxim, ceftriaxonă	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	±	R/±	R/+	R	R	R
Ceftazidim	+	+	+	R		+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	R	±	R	R	R
Eritromicină	+	+	+	R	±	+	(+)	±	R	+	R	R	R	R	R	R	±	±	+	+	R
Clindamicină	+*	+*	+*	R	+*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+	+	R	R	R
Tetracicline	+*	+*	±	+	+	+	(+)	+	+	R	±	R	R	(+)	(±)	R	±	±	+	+	+
Cloramfenicol	+	+	+	+	+	+	+	+*	+	±	+	±	+	+*	+	R	+	+	+	+	+
Ciprofloxacin	±	±	+	±	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	R	R	R	R	R
Gentamicină, tobramicină, amikacină	+	+	R	R	R	R	R	+	+	+*	+	+	+*	(+)	(+)	+*	R	R	R	R	R
Sulfonamide	+		±	±	(±)	±	±	±	±	±	±	±	R	±	±	R	R	R	+	R	R
Trimetoprim-sulfametoxazol	+		+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	R	+	+	R	R	R	+	R	R

+ - sensibil; R – rezistent; ± - unele tulpini rezistente; ( ) – terapie inadecvată; * - puține tulpini rezistente

BCU IAȘI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Factorii care țin de gazdă

Testele de sensibilitate in vitro nu coincid cu rezultatele clinice, deoarece intervin factorii care țin de gazdă mai ales circulația sanguină și activitatea fagocitară a țesuturilor. Infecțiile pot evolua rapid la pacienții cu deficiențe ale fagocitozei ca în cazul bolilor hematologice (leucemii în care funcția fagocitară este modificată fie de boală, fie prin utilizarea agenților citotoxici care distrug atât celule bolnave cât și pe cele sănătoase).

Conform acestor circumstanțe este necesară selectarea agenților cu acțiune bactericidă (aminoglicozide, peniciline cu spectru larg, cefalosporine și quinolone).

Unii agenți patogeni sunt localizați intracelular în fagocite și sunt relativ protejați de acțiunea agenților care pătrund în concentrații mici intracelular (peniciline, cefalosporine). Eritromicina, rifampicina, cloramfenicolul pătrund eficient în celulele fagocitare. În infecțiile cu *Legionella* (localizată intracelular) rifampicina și/sau eritromicina sunt eficiente.

Sarcina crește riscul toxicității unor agenți antibacterieni pentru mamă, afectează distribuția în organism și farmacocinetică. Fluoroquinolonele, claritromicina, eritromicina, tetraciclina sunt contraindicate fie datorită toxicității, fie necunoașterii siguranței în administrare.

Factori farmacologici

Procese care stau la baza cineticii substanțelor medicamentoase

Cinetica medicamentelor presupune procese care intervin în diverse etape ale circulației lor prin organism: trecerea prin membrane, legarea de proteine și transformarea biochimică a moleculelor.

Trecerea prin membrane. Membranele sunt formate dintr-un strat bimolecular de fosfolipide care explică permeabilitatea pentru moleculele lipofile. Proteinele globulare și glicoproteinele, încorporate în masa lipidică, formează sau delimitează canale apoase sau pot servi drept transportori. *Penetrarea* sau *filtrarea* implică trecerea prin pori sau alte discontinuități ale membranei lipidice umplute cu apă. Diametrul mic al porilor membranelor celulare (aproximativ 8 Å) permite trecerea moleculelor hidrosolubile cu masa moleculară mică (< 100). Prin porii cu diametrul mai mare (60-80 Å) trec molecule mari, nelegate de proteine, care reprezintă un factor limitant.

Difuziunea simplă presupune traversarea fazei lipidice membranare de către medicamente liposolubile.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Solubilitatea este influențată direct de *gradul disociației electrolitice*. Majoritatea medicamentelor sunt electroliți slabi care în soluție apoasă dau un amestec de ioni şi molecule neionizate. Ionii sunt slab solubili în grăsimi şi nu pot trece prin membrane; moleculele neionizate sunt în general liposolubile şi difuzează prin faza lipidică membranară. Liposolubilitatea medicamentelor este în funcție de constanta de ionizare proprie moleculei, pKa. La valori medii de pH, substante cu un pK curpins între 3 şi 10 au numeroase molecule neionizate care trec prin membrane. Alcalinitatea mediului, pentru medicamente acide şi aciditatea pentru formele bazice, cresc proporția formelor ionizate micşorând capacitatea de trecere prin membrane.

Legarea de proteinele plasmatice. Medicamentele se leagă mai ales de albumine, care reprezintă ½ din proteinele plasmatice, la nivelul grupărilor polare ale aminoacizilor. Fixarea este reversibilă în majoritatea cazurilor. Moleculele slab acide (penicilina G, oxacilina, cloxacilina, tetracicline, lincomicina, novobiocina, acidul nalidixic, sulfamide) se leagă în procent mare de albumine.

Transformarea biochimică a medicamentelor are loc mai ales în ficat (oxidări, reduceri, hidrolize, conjugări) sub acțiunea enzimelor microzomiale metabolizante şi a celor nemicrozomiale. Aceste enzime mai pot fi prezente în rinichi, mucoasa intestinală, plasmă şi alte țesuturi.

Absorbția, distribuția, metabolizarea şi excreția substantelor medicamentoase

Substanțele medicamentoase, administrate pe diferite căi, ajung în sânge. Administrarea intravasculară (intravenoasă, intraarterială) introduce medicamentul direct în sânge, fără intervenția procesului de absorbție. Administrarea extracutanată, pulmonară, rectală, transdermică, presupune un proces de *absorbție* pentru a ajunge în circulația sanguină.

După absorbție medicamentul este *distribuit* în diferite țesuturi ale organismului şi aceasta depinde de debitul sanguin la nivelul țesuturilor, de gradul de legare de proteinele plasmatice şi tisulare, de trecerea prin membranele biologice.

Concentrația serică a agenților antimicrobieni trebuie să atingă concentrația minimă necesară pentru a inhiba dezvoltarea, adică concentrația minimă inhibitorie (CMI). Deoarece majoritatea infecțiilor sunt extravasculare, antibioticul trebuie să ajungă la locul infecției. Când infecția este localizată în zone unde penetrarea este mai slabă (l.c.r., ochi, prostată, vegetații cardiace) sunt necesare pentru vindecare doze parenterale mari sau administrare locală timp îndelungat.

Eliminarea substanței medicamentoase se face prin urină, fecale, transpirație, salivă, aerul respirat prin plămâni, laptele matern.

Modalitățile principale de epurare sunt bioinactivarea prin metabolizare în ficat şi excreția urinară. Prin metabolizare poate avea loc transformarea în metaboliți cu acțiune farmacologică, sau

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

o inactivare a substantei medicamentoase. Sunt compuşi care se excretă prin bilă şi pot fi eliminaţi nemodificaţi prin fecale.

Clearance-ul este un parametru farmacocinetic primar care arată viteza de epurare relativ la concentraţia medicamentului în lichidele biologice.

Cum excreţia urinară este o cale importantă de eliminare, insuficienţa renală are ca efect un clearance scăzut al medicamentului şi prin urmare, epurarea lentă din organism. Adminstrarea de doze uzuale duce la acumulări mari şi la posibilitatea apariţiei toxicităţii.

Afecţiunile hepatice (hepatite, ciroze) pot determina un clearance medicamentos scăzut sau crescut. In bolile hepatocelulare avansate scăderea clearance-ului medicamentos este de aproximativ 2-5 ori.

Concentraţia plasmatică a medicamentelor

Pornind de la faptul că mărimea răspunsului terapeutic şi toxicitatea sunt funcţie de concentraţia substanţei medicamentoase la locul acţiunii, o terapie poate fi ineficientă fie din cauza unei concentraţii prea mici, fie din cauza unor concentraţii mari, toxice. Optimizarea terapiei se poate realiza prin menţinerea concentraţiilor plasmatice ale medicamentului în domeniul terapeutic. Variaţiile genetice ale ratelor de eliminare, interacţiunile cu alte medicamente, afecţiuni care induc modificări în eliminare şi distribuţie, precum şi o serie de alţi factori, produc o mare diversitate de niveluri plasmatice la pacienţi care au primit aceeaşi doză.

In Tabelul 12.2 sunt prezentate concentraţiile plasmatice ale unor agenţi antimicrobieni asociate cu efecte adverse la majoritatea pacienţilor

Tabel 12.2 Concentraţiile plasmatice ale unor agenţi antimicrobieni: valori eficiente şi valori care produc efecte adverse

Agent antimicrobian	Eficienţă	Efecte adverse
Carbenicilină	100 µg/ml	300 µg/ml
PenicilinăG	1-25 µg/ml	
Gentamicină	5 µg/ml	10 µg/ml
Amikacină	20 µg/ml	40 µg/ml

Selectarea agenţilor antimicrobieni

Eficienţa clinică depinde de concentraţiile agentului realizate la locul infecţiei, concentraţii care sunt influenţate de factori farmacologici: absorbţie, distribuţie, metabolizare şi excreţie.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În administrarea orală, absorbția intestinală trebuie să fie satisfăcătoare; aceasta poate fi modificată de factori cum ar fi prezența hranei, rezecții chirurgicale, voma și în aceste situații se alege calea parenterală care are avantajul de a asigura mai rapid concentrații eficiente de agent antimicrobian.

Alegerea agentului depinde și de locul anatomic al infecției. In distribuția agentului liposolubilitatea acestuia are rol preponderent.

Aminoglicozidele au liposolubilitate redusă și deși ating concentrații eficiente în fluidele extracelulare, ajung greu în lichidul cerebrospinal (*l c r*).

Difuzia antibioticelor în țesuturi și organe este diferită funcție de produsul medicamentos:

- antibiotice care realizează concentrații urinare mari: beta-lactamine, aminoglicozide, colistin, quinolone, sulfamide, cotrimoxazol, nitrofurani;
- antibiotice cu care se obțin concentrații biliare mari: metampicilina, cloramfenicol, tetracicline, rifamicine, lincosamine, cotrimoxazol;
- cu difuzie limfatică: cloramfenicol, cotrimoxazol;
- cu difuzie tisulară bună: tetracicline, cloramfenicol, macrolide, beta-lactamine, cotrimoxazol, fluoroquinolone;
- cu difuzie intracelulară: tetracicline, cloramfenicol, rifampicina, cotrimoxazol, fluoroquinolone;
- cu difuzie în *l c r* : ampicilină, cefalosporine de generația a III-a, cloramfenicol, fosfomicină, cotrimoxazol, fluoroquinolone;
- cu difuzie în țesutul osos: macrolide, rifampicina, beta-lactamine, aminoglicozide, fluoroquinolone.

Prezența inflamației influențează penetrarea agentului în țesuturi: antibioticele beta-lactamice străbat ușor meningele inflamat și realizează în *l c r* concentrații eficiente. Alți agenți cum ar fi cloramfenicolul sunt mai puțin influențați de prezența sau absența inflamației meningelui.

Concentrațiile terapeutice din canalul biliar și vezica biliară sunt dependente de excreția biliară. În infecțiile biliare concentrațiile agentului nu ating niveluri terapeutice decât prin mărirea dozei. În cazul agenților antimicrobieni care se elimină predominant hepatic sau renal, doza trebuie redusă, când funcțiile acestor organe sunt alterate.

Reacții adverse medicamentoase

Agentul riscă să devină toxic prin acumulare în rinichi, când funcția excretorie este modificată, concentrația urinară scade și agentul este eliminat mai ales prin filtrare glomerulară.

Aminoglicozidele, acidul nalidixic, nitrofurantionul pot fi cauza eșecului terapeutice în infecțiile urinare, când pacientul are funcția renală modificată.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Principalele riscuri toxice ale agenților antimicrobieni sunt următoarele:

- renale – în cazul cefaloridinei, aminoglicozidelor, polimixinelor, glicopeptidelor, sulfamidelor, tetracicline, meticilină;
- cohleo-vestibulare (vertije, surditate): aminoglicozidele și glicopeptidele;
- sanguine: aplazia dată de cloramfenicol, agranulocitoza cauzată de sulfamide;
- hepatice: sunt mai rare atunci când se respectă patologia corectă; pot fi cauzate de tetracicline, rifampicine, novobiocină, sulfamide;
- alergice: erupții cutanate, febră, eozinofilie, șoc anafilactic; agenți cauzali: beta-lactaminele, sulfamidele;
- riscuri toxice pentru făt pe parcursul sarcinii: aminoglicozidele, cloramfenicol, sulfamide, trimetoprim, quinolone, nitrofurani;
- riscuri toxice pentru nou-născuți: sulfamide, cloramfenicol, quinolone, tetracicline.

Rezistența la agenții antimicrobieni

Rezistența la agenții antimicrobieni, care poate fi naturală sau dobândită este rezultatul modificării permeabilității peretelui celular, a alterării situs-urilor de fixare, a inactivării enzimatice.

Rezistența dobândită apare prin adaptare, mutație sau transfer de gene. Mutațiile spontane apar cu frecvență scăzută, ca în cazul bacilului tuberculozei, când în cadrul populației doar un număr foarte mic de indivizi este rezistent la izoniazidă; utilizarea acestui agent singur duce, la selectarea unei subpopulații rezistente.

Un mecanism de rezistență recunoscut recent, este afluxul de antibiotice din celulă printr-un mecanism consumator de energie. Mecanismul asigură rezistența la tetracicline și macrolide.

Rezistența genetică poate fi cromosomală sau plasmidică. Plasmide care mediază rezistența, prezente mai ales la patogenii Gram-negativi enterici pot fi transferate, prin conjugare la bacteriile aceleeași specii sau care aparțin altor genuri.

Plasmidele pot codifica rezistența pentru mai multe antibiotice. Cunoașterea epidemiologiei rezistenței patogenilor din mediul de spital, mai ales a celor din secțiile de terapie intensivă, este indispensabilă pentru orientarea terapiei adecvate.

Eșecul terapeutic asociat cu multirezistența la agenții antimicrobieni

Multe microorganisme, în ultimii ani au devenit multi-rezistente, fie prin achiziționarea unor beta-lactamaze (enterococi), fie prin prezența concomitentă a altor mecanisme de rezistență

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(*Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis*). Aceste bacterii sunt responsabile în mare parte de infecţiile de spital, care afectează pacienţii din sediile de arşi, cardiologie, terapie intensivă. Stafilococii rezistenţi la meticilină (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) au capacitatea de a coloniza personalul şi pacienţii şi se răspândesc rapid printre aceştia.

Apariţia enterococilor multirezistenţi (incluzând rezistenţa la glicopeptide, aminoglicozide, beta-lactamine) a complicat tratamentul infecţiilor cauzate de aceste bacterii. Producerea de beta-lactamază este un aspect deosebit, deoarece este transferabilă şi asociată în mod obişnuit cu rezistenţa înaltă la gentamicină.

Rezistenţa la *Mycobacterium tuberculosis* a crescut ca urmare a terapiei inadecvate sau a pacienţilor necooperanţi (persoane fără adăpost, alcoolici, drogaţi, emigranţi).

Pattern-ul de rezistenţă variază, dar include frecvent rezistenţa la rifampicină şi izoniazidă.

Chimioterapia combinată

În general, antibioticele sunt utilizate singure, dar sunt situaţii când, pentru a preveni instalarea rezistenţei pe parcursul terapiei, se folosesc combinaţii de agenţi antimicrobieni.

Acidul fuzidic, utilizat în monoterapie, în tratarea infecţiilor cauzate *de Staphylococcus aureus* duce la instalarea rapidă a rezistenţei; asocierea acestuia cu flucloxacilina, previne acest fenomen. De asemenea, tuberculoza este tratată cu minimum doi agenţi, cum ar fi rifampicina şi izoniazida: asocierea lor previne apariţia rezistenţei.

Efectul combinaţiilor dintre două antibiotice poate fi sinergic, indiferent sau antagonist. În cazul sinergismului, microorganismul este inhibat de concentraţii mai mici decât ale fiecărui agent singur şi asocierea este eficientă în terapia unor infecţii, cum ar fi: endocarditele enterococice, când ampicilina şi gentamicina, combinate au acţiune sinergică. Un alt avantaj al asocierii sinergice constă în reducerea dozei pentru agenţii toxici. De exemplu, în meningitele determinate de fungul *Cryptococcus neofarmans* asocierea amfotericinei B cu 5-fluocitozina scurtează durata terapiei şi reduce astfel riscul toxicităţii determinat de agentul antifungic.

Aplicarea terapiei combinate este indicată mai ales în infecţiile mixte când un singur agent nu poate acoperi toţi patogenii cauzali.

În infecţiile intra-abdominale, prezenţa florei mixte aerobe şi anaerobe necesită utilizarea a doi eventual trei agenţi, de obicei metronidazol în asociere cu aminoglicozide sau cefalosporine cu spectru larg.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Asocierile de agenţi antimicrobieni sunt indicate şi în infecţiile severe cu microorganisme neidentificate încă; terapia "oarbă" include frecvent beta-lactamine cu spectru larg în combinaţie cu aminoglicozide. Această terapie este remaniată după obţinerea datelor de laborator privind agentul cauzal al infecţiei şi sensibilitatea la antibiotice.

Suprainfecţiile

Agenţii antimicrobieni acţionează nu numai asupra agenţilor cauzali ai infecţiei ci şi asupra florei bacteriene normale, mai ales de la nivelul mucoaselor şi tegumentului. Rezultatul este multiplicarea microorganismelor rezistente care generează suprainfecţia. Pacienţii care au primit terapie cu agenţi antimicrobieni cu spectru larg, cum ar fi ampicilina sau tetraciclina fac infecţii orale sau vaginale cu *Candida*. Cauza colitelor pseudo-membranoase este multiplicarea tulpinilor de *Clostridium difficile* producătoare de toxine, prezent în intestin, ca urmare a tratamentului cu clindamicină sau alte antibiotice cu spectru larg.

Posologia şi căile de administrare

Alegerea căii de administrare depinde de natura antibioticului, gravitatea infecţiei, starea bolnavului. Administrarea parenterală asigură absorbţia rapidă; calea orală, mai comodă, este utilizată în cazurile infecţiilor digestive.

Posologia trebuie să fie corectă, deci suficientă pentru ca terapia să fie eficientă: se vor evita dozele mari pentru a nu realiza concentraţii serice toxice. Ajustarea dozelor, recomandate uzual se poate face în două circumstanţe:

- în *infecţii severe* (septicemii, endocardite) dozele pot fi mărite, pentru a obţine concentraţii eficiente asupra bacteriilor mai puţin sensibile (beta-lactamine, mai ales peniciline);
- *în cazul insuficienţelor viscerale*, mai ales renale, hepatice, posologia anumitor antibiotice trebuie redusă pentru a evita acumulările toxice: aminoglicozide, polimixine, cefalosporina, glicopeptide, pentru care concentraţiile terapeutice sunt apropiate de cele toxice. Produşii eliminaţi biliar (ampicilina, tetracicline, rifampicine, macrolide, acid fusidic, novobiocină) nu crează probleme; doar în cazul insuficienţei hepatice, dozele trebuie reduse.

Ritmul de administrare

Doza stabilită, este repartizată, în general în mai multe prize, pe parcursul zilei, funcţie de rapiditatea eliminării antibioticului şi pentru a asigura niveluri serice eficiente.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezultatul terapiei

Eficiența: în majoritatea cazurilor efectul este rapid favorabil: febra şi alte semne ale infecției dispar iar examenele bacteriologice sunt negative.

Eşecul terapeutic: în unele cazuri, terapia este clinic ineficientă din diferite cauze:

- diagnostic greşit;
- posologia insuficientă, care nu asigură concentrații suficiente de agent antimicrobian în sânge sau țesuturi;
- persistența focarului infecțios, care datorită structurii anatomice, nu permite penetrarea suficientă a antibioticului; se impune administrarea locală a agentului antimicrobian, drenajul sau tratamentul chirurgical al focarului infecțios;
- febra terapeutică: reacție venoasă la perfuzie, abces în punctul de injectare, intoleranța la antibiotic (ex. la peniciline);
- cauze bacteriologice: erori în precizarea diagnosticului bacteriologic, apariția rezistenței dobândite:
- durată inadecvată a terapiei;
- pacienți necooperanți.

Durata tratamentului

Este variabilă, funcție de natura şi gravitatea infecției. Terapia poate consta într-o administrare unică (gonococii) sau se prelungeşte pentru 4 – 6 săptămâni în endocardite, stafilococii, infecții osteo-articulare. În infecțiile acute (respiratorii, urinare) durata medie a tratamentului este de 5–10 zile.

Oprirea tratamentului este totdeauna bruscă, fără diminuarea progresivă a dozelor, care ar duce la reducerea nivelurilor sanguine şi tisulare eficiente.

Reacții adverse la agenții antimicrobieni

Efectele benefice ale terapiei antimicrobiene sunt asociate de riscul apariției efectelor nedorite.

Aproximativ 20-25% din pacienți pot face greşeli în autoadministrarea medicamentelor prescrise şi sunt responsabile de apariția efectelor adverse. In mod similar pacienții comit erori la

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

administrarea medicamentelor eliberate fără rețetă, ca urmare a nerespectării instrucțiunilor de utilizare, prevăzute în prospecte.

Chiar şi utilizate conform recomandărilor, medicamentele pot avea uneori consecințe nedorite. Administrarea concomitentă a mai multor medicamente poate duce la interacțiuni negative.

Ca etiologie majoritatea reacțiilor adverse rezultă din acțiunea exagerată, dar anticipată a medicamentului şi din efectele toxice neasociate cu acțiunile farmacologice dorite. Mecanismele de toxicitate extrafarmacologică includ: citotoxicitatea directă, inițierea unor răspunsuri imune anormale, perturbări ale proceselor metabolice la persoanele cu defecte enzimatice genetice.

Când se prescrie un medicament unui pacient vârstnic trebuie avută în vedere posibilitatea unei excreții defectuoase a acestuia, prin diminuarea metabolizării hepatice sau a excreției renale.

Exagerarea efectelor farmacologice scontate au drept cauză frecventă concentrația anormal de mare a medicamentului la locul de acțiune. De exemplu, reducerea volumului de distribuție, scăderea ratei de metabolizare sau de excreție, determină o concentrație la nivelul locului de acțiune mai mare decât cea aşteptată, urmată de creşterea efectului farmacologic.

Recent a fost identificat un citocrom specific P450s implicat în metabolismul antibioticelor. Dacă prin teste se va putea caracteriza acitivitatea specifică individuală a citocromului P450s, va fi posibilă identificarea indivizilor cu risc particular de reacții adverse asociate cu concentrația medicamentului. Persoanele la care activitatea enzimatică este diminuată sau absentă, concentrația medicamentului este mai mare decât cea normală şi poate avea efecte toxice.

Modificarea curbei doză-răspuns datorită unei sensibilități crescute la locul de acțiune, determină un efect amplificat al medicamentului, la aceeaşi concentrație.

Forma curbei doză-răspuns poate determina apariția unor reacții adverse; astfel, o curbă doză-răspuns abruptă sugerează o toxicitate legată de doză, deoarece o creştere a dozei duce la modificarea efectului farmacologic.

Terapia concomitentă cu alte medicamente poate afecta farmacocinetica prin alterarea biodisponibilității, a legării de proteinele plasmatice, a ratei de metabolizare sau excreție. Farmacodinamica se poate modifica prin competiție pentru situsurile de la nivelul receptorului, prin împiedicarea ajungerii medicamentului la locul de acțiune sau prin antagonizarea sau creşterea efectului farmacologic.

Inhibarea metabolizării unui medicament de către altul poate avea loc când ambele medicamente se leagă de acelaşi citocrom P450.

Reacțiile citotoxice apar ca urmare a legării ireversibile a medicamentului sau metaboliților acestuia de macromolecule tisulare, prin legături covalente, determinând lezarea țesutului respectiv.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un astfel de efect advers este hepatotoxicitatea asociată cu izoniazida din metabolizarea căreia rezultă metaboliți reactivi care se leagă covalent de macromolecule hepatice, ducând la necroza hepatică.

Mecanisme imune. Compuşii cu greutatea moleculară mică (sub 2000) au imunogenicitate scăzută. Stimularea sintezei de anticorpi sau sensibilitatea limfocitelor sub acțiunea unui medicament sau a unui metabolit al acestuia necesită activarea in vivo şi legarea covalentă de proteine, zaharuri sau acizi nucleici. Stimularea sintezei de anticorpi sub acțiunea unui medicament poate media lezarea tisulară. Anticorpii pot ataca medicamentul legat covalent de o celulă, producând distrugerea celulei, ca în cazul anemiei hemolitice induse de penicilină. Complexele anticorp-antigen medicamentos pot fi adsorbite pasiv pe suprafața unei celule, care apoi este distrusă prin activarea complementului (de exemplu în trombocitopenia indusă de chinină). Medicamentele sau metaboliții lor activi pot induce alterări ale țesutului-gazdă, prin capacitatea antigenică şi stimularea sintezei de autoanticorpi. Sinteza de autoanticorpi poate fi stimulată de medicamente care fie nu interacționează niciodată cu antigenele gazdei, fie nu au nici o asemănare cu țesutul gazdă.

Boala serului este determinată de depozitarea complexelor imune circulante anticorp-medicament pe suprafața endoteliului. Activitatea complementului generează o serie de factori chemotactici locali şi un răspuns inflamator la locul fixării complexelor. Ca manifestări apar artralgii, urticarie, limfadenopatie, glumerulonefrită. Administrarea de penicilină este o cauză frecventă a bolii serului. Numeroşi agenți antimicrobieni induc o producție crescută de Ig E, care se ataşează la membrana mastocitelor şi inițiază o serie de modificări biochimice în mastocit, cu eliberearea unor mediatori responsabili de urticarie, rinoree, eritem, hipotensiune, semne specifice în anafilaxie. Agenții antimicrobieni care pot genera reacții adverse sunt incluşi în Tabelul 12.3.

Tabel 12.3 Manifestări clinice ale reacțiilor adverse la agenții antimicrobieni

Manifestări clinice	Agent
I. Manifestări multisistemice	
Anafilaxie	Cefalosporine Penicilina Streptomicina
Lupus indus medicamentos	Cefalosporine Izoniazida Sulfamide
Febra	Acid aminosalicilic Amfotericina B Novobiocina Peniciline
Boala serului	Peniciline Streptomicina Sulfonamide

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. Manifestări endocrine

Ginecomastie	Griseofulvina Izoniazida Sulfonamide
Tulburări ale funcției tiroidiene	

III. Manifestări metabolice

Hiperbilirubinemie	Novobiocina
Hipopotasemie	Rifampicina Amfotericina B Gentamicina Tetraciclina (degradată)
Exacerbarea porfiriei	Griseofulvina Rifampicina Sulfonamide

IV. Manifestări dermatologice

Eritem multiform sau sindrom Steven-Johnson	Peniciline Sulfamide Sulfone Tetracicline
Eritem nodos; dermatită exfoliativă	Peniciline Sulfonamide Bleomicina
Hiperpigmentație Erupții lichenoide Fotodermatite	Acid aminosalicilic Acid nalidixic Griseofulvina Sulfonamide Tetracicline
Rash Necroliză epidermică toxică	Ampicilina Acid nalidixic Peniciline Sulfonamide
Urticarie	Peniciline Sulfonamide

V. Manifestări hematologice

Agranulocitoza	Cloramfenicol Cotrimoxazol Sulfonamide
Anomalii de coagulare	Cefamandol Cefoperazon Moxalactam
Eozinofilie	Acid aminosalicilic Eritromicină-estolat Nitrofurantoin Sulfonamide
Pancitopenie (anemie aplastică)	Cloramfenicol Sulfonamide
Trombocitopenie	Carbenicilină Clotrimoxazol Izoniazida Novobiocina Ticarcilina

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anemie hemolitică	Acid aminosalicilic Cefalosporine Izoniazida Peniciline Rifampicina Sulfonamide
	Acid aminosalicilic Acid nalidixic Cloramfenicol Cotrimoxazol Nitrofurantoin Sulfonamide

VI. Manifestări cardiovasculare

Durere toracică (nonischemică) Aritmii Cardiomiopatie	Bleomicina Eritromicina Daunorubicina Sulfonamide Ciclosporina
Hipertensiune	

VII. Manifestări respiratorii

Obstrucţii ale căilor aeriene (bronhospasm, astm)	Cefalosporine Penicilina Streptomicina
Infiltrate pulmonare	Bleomicina Mitomicina C Nitrofurantoin Sulfonamide
Depresie respiratorie	Aminoglicozide Polimixine

VIII. Manifestări gastrointestinale

Hepatită colestatică	Amoxicilina/Acid clavulanic Ciclosporine Eritromicina Flucloxacilina Nitrofurantoin
Diaree sau colită	Antibiotice cu spectru larg Clindamicina
Leziuni hepatocelulare difuze	Acid aminosalicilic Eritromicina Izoniazida Nitrofurantoin Rifampicina Sulfonamide Tetracicline
Calculi vezicali, pseudolitiază biliară	Ceftriaxona
Malabsorbţie	Acid aminosalicilic Antibiotice cu spectru larg Neomicina
Greaţă şi vărsături, colorarea dinţilor	Tetraciclina
Hiperplazie gingivală	Ciclosporina

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modificări ale gustului	Griseofulvina
	Rifampicina
Pancreatită	Sulfonamide

IX. Manifestări renale

Nefrita interstițială	Ciprofloxacin
	Peniciline, mai ales meticilina
	Sulfonamide
Disfuncție renală	Ciclosporina
Acidoza tubulară renală	Amfotericina B
	Tetraciclina degradată
Necroza tubulară	Aminoglicozide
	Amfotericina B
	Cefaloridina
	Colistin
	Ciclosporina
	Polimixine
	Sulfonamide
	Tetracicline

X. Manifestări neurologice

Exacerbarea miasteniei	Aminoglicozide
	Polimixine
Neuropatie periferică	Acid nalidixic
	Cloramfenicol
	Colistin
	Etambutol
	Izoniazida
	Metronidazol
	Nitrofurantoin
	Polimixina
	Streptomicina
	Tetracicline
Hipertensiune intracraniană	Acid nalidixic
Convulsii	Imipenem
	Izoniazida
	Peniciline

XI. Manifestări oculare

Alterări ale vederii în culori	Streptomicina
	Sulfonamide
	Acid aminosalicilic
Nevrită optică	Chinina
	Cloramfenicol
	Etambutol
	Izoniazida
	Streptomicina

XII. Manifestări otice

Surditate	Aminoglicozide
	Bleomicina
	Eritromicina
	Chinina
	Aminoglicozide
Tulburări vestibulare	Chinina

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XIII. Manifestări la nivelul muşchilor

Miopatie sau mialgie — Amfotericina B

XIV. Manifestări psihice

Stări delirante sau confuzive — Izoniazida, Peniciline

In studiile de premarketing se utilizează un număr mic de pacienţi şi de aceea nu pot fi identificate reacţiile adverse rare. Identificarea şi raportarea acestor efecte este o responsabilitate de prim ordin pentru clinician.

Alegerea terapiei antibacteriene

Stabilirea terapiei antimicrobiene depinde iniţial de diagnosticul clinic. În cele mai multe infecţii stabilirea diagnosticului clinic impune confirmarea laboratorului după examinarea probelor prelevate de la pacient, de preferat înaintea începerii terapiei. Izolarea agentului cauzal şi efectuarea testului de sensibilitate, contribuie la stabilirea precisă a diagnosticului şi la stabilirea terapiei raţionale. Atunci când documentarea microbiologică nu este posibilă, dar se cunosc totuşi cauzele microbiologice ale anumitor infecţii, sensibilitatea cunoscută a bacteriilor la agenţii antimicrobieni este esenţială pentru administrarea antibioterapiei eficiente.

Infecţiile tractusului respirator

Infecţiile respiratorii sunt frecvente şi se grupează în infecţii ale tractusului respirator superior, care includ urechea, gâtul, sinusurile nazale, traheea şi infecţii ale tractusului respirator inferior, care afectează căile aeriene, plămânii şi pleura.

Infecţiile tractusului respirator superior

Faringitele acute, sunt cauzate în mare măsură de virusuri, mai puţin de 20% au origine bacteriană şi răspund la terapia antimicrobiană. Totuşi antibioticele sunt prescrise pe scară largă chiar dacă infecţia nu a fost documentată bacteriologic. *Streptococcus pyogenes* este cel mai important patogen şi, după 10 zile de terapie cu penicilină administrată oral, este eradicat. Faringita cu *Corynetobacterium diphteriae* pune în pericol viaţa. Pseudomembrana care acoperă mucoasa poate obstrucţiona căile aeriene.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecțiile virale afectează curent urechea medie şi sinusurile. Virusurile herpetice infectează buzele, cauzând "răni reci" şi leziuni pe mucoasa bucală, limbă şi peretele faringian. Afta cauzată de *Candida albicans* afectează mai ales pacienții imunocompromişi.Infecțiile bacteriene se asociază adesea cu infecțiile virale. Infecțiile bacteriene sunt dominate de *Streptococcus pneumoniae* şi *Haemophilus influenzae*, în terapia cărora se utilizează frecvent ampicilina sau amoxicilina, care pătrunde bine în urechea medie şi sinusuri şi sunt bine tolerate. La copii, *H. influenzae* este cauza cea mai frecventă a infecțiilor laringiene. Totuşi, răspândirea tulpinilor de *Haemophilus influenzae* rezistente la aminopeniciline, prin producerea de beta-lactamaze, afectează eficiența terapeutică. Asocierea amoxicilinei cu acidul clavulanic, care inactivează beta-lactamazele, amplifică eficiența amoxicilinei din combinație. Bacteriile frecvent izolate din secrețiile urechii medii în otita medie sunt *S. pneumoniae, H. influenzae, S. aureus*. Tratamentul otitei medii include amoxicilina/acid clavulanic, trimetoprim-sulfametoxazol şi axetil-cefuroxim.

Eritromicina, utilizată în terapia otitelor acute medii, are dezavantajul că atinge niveluri adecvate în lichidul urechii medii după 15 ore de la administrare.

Infecțiile tractusului respirator inferior

Infecțiile respiratorii joase (pneumonii, abcese pulmonare, bronşite, complicații infecțioase ale fibrozelor chistice) sunt cauzate de numeroşi patogeni, adesea greu de diagnosticat bacteriologic prin culturile de spută, care adesea se contaminează cu flora normală a trastusului respirator superior, în cursul expectorației. Pentru a evita contaminarea, o alternativă ar fi recoltarea sputei, prin aspirare, direct din trahee, sau a fluidului pleural din cavitatea pleurală. În numeroase cazuri, terapia este stabilită funcție de diagnosticul clinic.

Pneumonia este cauzată de numeroşi patogeni: virusuri, bacterii şi la pacienții imuno compromişi de paraziți şi fungi (Tabelul 2).

Streptococcus pneumoniae este cel mai comun agent al pneumoniei care răspunde la penicilină. Pneumoniile cauzate de *Legionella* dobândite adesea în timpul vacanțelor cu cazări în hotelurile din zona Mediteranei, sunt tratate cu eritromicină şi dacă formele sunt severe, se asociază rifampicina.

Abcesele pulmonare sunt cauzate de bacilii Gram-negativi şi *Staphylococcus aureus*.

Aspirarea secreției orofaringiene poate duce la formarea de abcese şi expectorarea unei spute urât mirositoare indică prezența speciilor anaerobe. Penicilina este activă asupra florei orofaringiene, iar metronizadolul este indicat în infecțiile cauzate de anaerobi. În infecțiile cu bacili Gram-negativi, terapia include aminoglicozide asociate sau nu cu cefalosporine cu spectru larg.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pneumoniile stafilococice sunt infecţii grave, care impun administrarea unor doze mari de flucloxacilină, în monoterapie sau asociată cu acid fusidic.

Fibrozele chistice sunt anomalii congenitale care afectează adesea plămânul şi se complică cu infecţii, cauzate de *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* şi *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* este un cofactor care duce la distrugerea ţesutului pulmonar şi uneori, decesul pacienţilor. Infecţiile cu *Pseudomonas aeruginosa* sunt mai greu de tratat şi necesită spitalizări repetate: se administrează aminoglicozide singure sau asociate cu peniciline antipseudomonas. Efecte benefice se obţin şi prin inhalarea de aerosoli cu antibiotice.

Infecţii ale tractusului urinar

Infecţiile tractusului urinar sunt boli bacteriene frecvente, care afectează toate vârstele şi predomină la sexul feminin; totuşi la vârstnici, diferenţele distribuţiei pe sexe dispar. Infecţiile sunt favorizate de factori care modifică fluxul urinar: anomalii congenitale, refluxul urinei din vezică în uretere, tumori, şi la bărbaţi, afecţiunile prostatei.

O cauză importantă a infecţiilor urinare o reprezintă cateterismele vezicale.

Uretrocistitele sunt date în majoritatea cazurilor de *Escherichia coli*. *Staphylococcus saprophyticus* produce curent urocistite la femeile tinere.

Prostatitele, excluzând infecţia gonococică, sunt în peste 80% din cazuri determinate de *Escherichia coli*.

Pielonefritele sunt cauzate predominant de tulpini de *Escherichia coli* uropatogene.

La copiii preşcolari este necesară tratarea infecţiilor tractusului urinar şi menţinerea sterilă a urinei pentru a asigura maturarea normală a rinichilor.

Speciile de *Proteus*, *Klebsiella*, alcalinizează urina şi favorizează producerea de calculi.

În terapia infecţiilor urinare, agentul antimicrobian ales trebuie să asigure concentraţii urinare adecvate şi la nivelul rinichilor. În cazul copiilor şi femeilor însărcinate este necesară prudenţă în administrarea prelungită sau repetată a antibioticelor. Alegerea agentului se face pe baza diagosticului bacteriologic şi a sensibilităţii bacteriei infectante. Pentru numeroşi patogeni sensibilitatea este variabilă şi multe din prescripţiile care includ sulfamide sau ampicilină au eficienţă redusă.

Infecţiile urinare comunitare sunt mai uşor de tratat: trimetoprimul, ciprofloxacinul, ampicilina, sunt utilizate frecvent. Tratamentul cu durata de 3 zile este de obicei satisfăcător; eficiente s-au dovedit şi dozele unice de amoxicilină (3g) sau cotrimoxazol (1920 mg).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecțiile urinare repetate indică modificări patologice care trebuie corectate chirurgical. În aceste circumstanțe este important ca urina să se mențină sterilă, condiție asigurată prin cure repetate cu antibiotic. Trimetoprimul este în mod obișnuit prescris în chemoprofilaxia de lungă durată: realizează concentrații urinare mari peste noapte și în general, asigură sterilitatea urinei.

Infecția rinichilor impune utilizarea unor agenți care ating concentrații mari în țesutul renal. Se administrează cefotaxim sau ciprofloxacin, deoarece aminoglicozidele, deși realizează concentrații mari în cortexul renal, prezintă nefrotoxicitate.

Infecțiile prostatei au tendința de a fi persistente și sunt dificil de tratat; aciditatea mare de la nivelul prostatei inhibă penetrarea multor antibiotice utilizate în tratarea infecțiilor urinare. Agenții cu caracter bazic, ca eritromicina, ating concentrații bune dar nu sunt activi asupra patogenilor implicați în prostatite.

Trimetoprimul este indicat frecvent, deoarece realizează concentrații eficiente în prostată și are acțiune asupra multor agenți patogeni; tratamentul este de durată (câteva săptămâni), deoarece recăderile sunt frecvente.

Infecțiile gastrointestinale

Infecțiile intestinului sunt cauzate de virusuri, bacterii, paraziți și ocazional de fungi. Infecțiile virale sunt predominante dar nu răspund la agenții chemoterapeutici. Bacteriile produc infecții în urma invaziei mucoasei intestinale sau producerii de toxine. Uneori aceste mecanisme sunt asociate (Tabel 12.4).

Tabel 12.4 Infecții bacteriene ale intestinului; mecanismul de patogenitate

Agent patogen	Locul infecției	Mecanism
Camphylobacter jejuni	Intestinul subțire și gros	Invazivitate
Salmonella spp.	Intestinul subțire și gros	Invazivitate
Shigella spp.	Intestinul gros	Invazivitate ± toxine
Escherichia coli		
Enteroinvaziv	Intestinul gros	Invazivitate
Enterotoxigen	Intestinul subțire	Toxine
Clostridium difficile	Intestinul gros	Toxine
Staphylococcus aureus	Intestinul subțire	Toxine
Vibrio cholerae	Intestinul subțire	Toxine
Clostridium perfringens	Intestinul subțire	Toxine
Yersinia spp.	Intestinul subțire și gros	Invazivitate
Bacillus cereus	Intestinul subțire	Invazivitate ± toxine
Vibrio parahaemolyticus	Intestinul subțire	Invazivitate ± toxine

În general antibioticele nu sunt recomandate în gastroenterite, dar trebuie remarcat că acestea scurtează durata infecției acute sau previn complicațiile inclusiv eliminarea gastrointestinală prelungită de patogeni care afectează sănătatea publică.

Cele mai multe infecții pot fi autolimitate dar formele severe trebuie spitalizate. În tratarea infecțiilor cu *Compylobacter* şi *Shigella* se administrează de preferință, eritromicina şi cotrimoxazol. In salmonelozele grave, mai ales la vârstele extreme, când pot apare efecte toxice sistemice şi septicemii, este indicată terapia cu cloramfenicol sau cotrimoxazol. În febrele tifoide şi paratifoide (febre enterice) cauzate de ingestia bacteriei (*Salmonella typhi* şi *Salmonella paratyphi*), terapia este obligatorie; antibioticul de elecție este ciprofloxacinul, dar o alternativă ar fi cotrimoxazolul sau cloramfenicolul. Eliminarea intestinală de *Salmonella typhi* este o complicație a febrei tifoide şi o problemă majoră pentru sănătatea populației. Terapia cu ciprofloxacin sau ampicilină poate elimina excreția prin vezica biliară, locul principal al infecției persistente la purtători. Şansele vindecării sunt diminuate în prezența pietrelor vezicale.

Holera este o toxiinfecția intestinală care produce epidemii în Asia. Pierderile hidroelectrolitice prin scaune şi vărsături (10 – 15l/zi) pun în pericol viața pacientului. Antibioticul de elecție este tetraciclina care elimină eficient agentul patogen din intestin, reduce durata bolii şi pierderile electrolitice. Sursa de infecție este reprezentată de bolnavi, purtători sănătoşi şi crustaceele acvatice. Holera se transmite prin apă şi alimente contaminte fecal.

Diareea turiştilor poate fi cauzată de numeroase specii patogene gastrointestinale, dintre care, *Escherichia coli* enterotoxigenă este cea mai frecventă. Terapia cu norfloxacin poate scurta perioada de boală (la pacienții cu infecții severe).

Infecții ale tegumentului şi țesuturilor moi

Infecțiile tegumentului şi țesuturilor moi sunt consecutive traumatismelor. Cu excepția unor virusuri, nici un alt microorganism nu poate trece de tegumentul normal. Întreruperea integrității acestei bariere determină infecții localizate, care se pot răspândi rapid la alte țesuturi.

Microorganismele responsabile de infecțiile tegumentare provin din microbiota normală.

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* şi bacteriile anaerobe sunt patogeni recunoscuți.

Virusurile afectează tegumentul şi mucoasele, ca urmare a infecțiilor generalizate sau localizate (herpes simplex).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Staphylococcus aureus produce infecții în urma deficienței barierelor locale antiinfecțioase (plăgi, arsuri) sau sistemice (diabet, malnutriție tulburări endocrine, terapie imunodepresivă). Purtători ai unor tulpini cu potențial patogen, rămân sănătoși.

Infecțiile stafilococice răspund la cloxacilină sau flucloxacilină, dar în general penicilina este ineficientă datorită inactivării prin producerea de penicilinază. *Staphylococcus aureus* este principalul agent al infecțiilor tegumentare localizate – foliculite – care uneori devin invazive, cu abcese supurative cunoscute sub numele de carbuncul sau furuncul antracoid, care necesită drenaj chirurgical.

Infecția stafilococică a glandelor sudoripare axilare sau perianale determină hidrosadenita. Infecția mucoaselor – otite, sinuzite – complică virozele respiratorii.

Streptococcus pyogenes produce numeroase infecții tegumentare: impetigo (piodermită streptococică), infecție superficială a tegumentului, frecventă în zonele umede și calde, foarte contagioasă; celulitele care afectează țesutul celular subcutanat și poate afecta sistemul limfatic cu evoluție spre septicemie; erizipelul (dermită streptococică, cu tendință invazivă localizată mai ales la nivelul feței și gambelor. Fasciitele necrozante sunt cele mai grave, cu progresie rapidă la nivelul tegumentului, țesutului subcutanat și muscular. Penicilina este antibioticul de elecție în terapia infecțiilor streptococice.

Bacteriile anaerobe sunt asociate caracteristic cu plăgile urât mirositoare.

Sporii de *Clostridium* proveniți din sol sau materii fecale, contaminează frecvent plăgile traumatice. Infecția mixtă cu bacterii aerobe favorizează colonizarea sau invazia țesuturilor subcutanate. În plăgile profunde, cu irigarea sanguină modificată, are loc mionecroza – gangrena gazoasă cu evoluție letală în absența tratamentului.

Tratamentul gangrenei gazoase impune debridarea plăgii cu eliminarea țesuturilor devitalizate sub protecția penicilinei.

Tratamentul arsurilor infectate, impune numeroase probleme. Plăgile arse sunt contaminate rapid cu bacterii care găsesc în exudat resurse proteice bogate. Stafilococii, streptococii dar mai ales *Pseudomonas aeruginosa* colonizează arsurile și pot duce, în cazuri grave, la septicemii.

Terapia infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa* este combinată și include aminoglicozide (gentamicina, amikacina, tobramicina), asociate cu peniciline antipseudomonas: azlocilina, ticarcilina, carbenicilina, ceftazidim. Utilizarea aminoglicozidelor se face sub controlul nivelurilor serice pentru a asigura concentrații terapeutice, fără a atinge limitele toxice, deoarece funcțiile renale sunt adesea afectate în zilele următoare producerii arsurilor grave.

Prezența în exces a sodiului complică utilizarea unor doze mari de agenți antipseudomonas, cum ar fi carbenicilina.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecțiile sistemului nervos central

Creierul, meningele şi măduva spinării sunt supuse infecțiilor hematogene, în cursul bacteriemiilor sau după fracturi, intervenții neurochirurgicale; uneori contaminarea se face pornind de la infecțiile sinusurilor sau a urechii medii.

Cele mai frecvente infecții virale ale sistemului nervos central sunt date de enterovirusuri şi de virusul parotiditei epidemice; au evoluție benignă.

Infecțiile bacteriene (meningite, abcese cerebrale), au risc mare de mortalitate şi pot determina distrugeri ale țesutului nervos sau alterări ale funcției intelectuale. Deşi rare, infecțiile fungice apar mai ales la pacienții imunocompromişi.

Meningitele bacteriene sunt cauzate de numeroase bacterii a căror incidență variază cu vârsta: la nou-născuți majoritatea infecțiilor sunt date de streptococi şi *Escherichia coli*, la preşcolari, *Haemophilus influenzae* este patogenul frecvent. Infecțiile cu *Neisseria meningitidis* sunt mai frecvente la vârstele de 5 – 15 ani iar la adulți predomină meningitele pneumococice.

Penicilina este antibioticul de elecție în meningitele streptococice şi pneumococice, iar penetrarea în *l c r* depinde de răspunsul imflamator al meningelui. Pentru a obține concentrații terapeutice în *l c r* sunt necesare doze mari, care în cazul meningitelor pneumococice, se administrează timp de 10-14 zile.

Ampicilina se utilizează în tratarea meningitelor cu *Haemophilus influenzae* numai după ce se constată absența producerii de beta-lactamaze, care conferă rezistență la acest agent.

În cazul tulpinilor beta-lactamazo-pozitive, se administrează cefotaxim sau ceftriaxonă.

Mortalitatea în meningitele cu *Escherichia coli* depăşeşte 40%; atingerea unor niveluri în *lcr* eficiente este o problemă. Cefalosporinele cu spectru larg (cefotaxim, ceftriaxona, ceftazidim) ating niveluri terapeutice bune în *l c r* şi sunt antibioticele de elecție în meningitele bacilare; durata tratamentului se prelungeşte pentru 2-4 săptămâni.

Abcesele cerebrale sunt distrugeri locale ale țesutului nervos şi măresc presiunea intracraniană. Sursa infecției este reprezentată de bacteriile prezente la nivelul sinusurilor şi a urechii medii; deseori infecția este pluribacteriană.

Cele mai comune sunt abcesele cerebrale cauzate de *Staphylococcus aureus* care necesită drenaj chirurgical.

În infecțiile mixte examenul de laborator poate oferi indicații privind terapia optimă. Agenții antimicrobieni sunt selectați pe baza abilității de a trece din *l c r* în țesutul cerebral.

Metronidazolul este o alternativă, dar nu este activ asupra streptococilor care trebuie tratați cu doze mari de penicilină. Aceşti agenți sunt adesea asociați.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Profilaxia infecţiilor bacteriene

Utilizarea agenţilor antimicrobieni în scopul prevenirii infecţiilor s-a amplificat. Se disting: antibioterapia preventivă de acoperire şi antibioterapia profilactică, mai ales în mediul chirurgical.

Antibioterapia preventivă, destinată prevenirii consecinţelor unor condiţii de igienă necorespunzătoare sau infecţiei cu bacili Gram-negativi, este periculoasă, deoarece se implică în creşterea frecvenţei suprainfecţiilor cu bacterii multirezistente.

Antibioprofilaxia este justificată într-un număr limitat de cazuri: când există riscul unei infecţii precizate, cu o bacterie a cărei sensibilitate este cunoscută şi poate fi prevenită prin administrarea de antibiotice înaintea dezvoltării infecţiei.

Indicaţiile antibioprofilaxiei

În domeniul medical:

- prevenirea reumatismului poliarticular acut prin terapie cu penicilină, pe perioade lungi;
- prevenirea la cardiaci a endocarditelor bacteriene, în urma manevrelor instrumentale în sfera buco-dentară, urinară; terapia este orientată împotriva streptococilor din cavitatea bucală sau enterococilor; penicilina G, amoxicilina, eritromicina sunt utilizate împotriva streptococilor iar contra enterococilor – asocierea de peniciline cu aminoglicozide.
- profilaxia meningitei cu meningococ, când anturajul unui bolnav justifică prescrierea rifamicinei, activă pe acest patogen.

În mediul chirurgical:

Profilaxia urmăreşte ca bacteriile să nu contamineze câmpul operator. Concentraţiile de antibiotic, prezente în zona de intervenţie, reduc rapid numărul bacteriilor potenţial infectante. Este important ca în scop profilactic, administrarea să fie limitată la perioada perioperativă: prima doză cu aproximativ o oră înaintea operaţiei şi încă două-trei doze postoperator. Prelungirea chemoterapiei este costisitoare şi măreşte riscul efectelor adverse sau a suprainfecţiei. In toate procedurile, exceptând cele colorectale, profilaxia este orientată predominant asupra stafilococilor.

Profilaxia este indicată când se fac implanturi de proteze: chirurgia cardiacă, vasculară, ortopedică. In Tabelul 12.5 sunt prezentate indicaţiile majore ale profilaxiei antibacteriene la adulţi, larg acceptate. Folosirea agenţilor antibacterieni la copii pentru prevenirea reumatismului articular acut şi a otitei medii în unele circumstanţe, este o practică frecventă .

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În chirurgia "murdară-contaminată" (biliară, gastro-duodenală, urologică, ginecologică) profilaxia este funcție de riscul de contaminare şi tipul intervenției; sunt indicate cefalosporinele de generația întâi şi a doua. O exemplificare a eficienței profilaxiei chirurgicale este din domeniul chirurgiei pe intestinul gros: înainte de utilizarea profilaxiei infecțiile postoperatorii depăşeau 30%; după aplicarea tratamentului profilactic au ajuns la aproximativ 5%.

Tabel 12.5 Profilaxia infecțiilor bacteriene la adulți

Condiții	Agent antimicrobian	Durata profilaxiei
Nechirurgicale		
-Leziuni cardiace susceptibile la endocardita bacteriană	Amoxicilina Mupirocina	Inainte şi după procedurile care cauzează bacteriemia Intranazal, 5 zile
-Infecții recurente cu *S. aureus*		
-Contact cu pacienții cu meningită meningococică	Rifampicina Penicilina V sau amoxicilina-acid clavulanic	2 zile 3-5 zile
-Răni prin muşcătură		
-Cistită recurentă	Trimetoprim-sulfametoxazol	3 ori/săpt. până la 1an sau după actul sexual
Chirurgicale		
-Curate (cardiace, vasculare, neurologice, ortopedice)	Cefazolină	Inainte şi după procedură
-Oculară	Combinații topice şi cefazolină subconjunctival	In timpul şi la sfârşitul procedurii
-Curate-contaminate (cap şi gât, gastroduodenale cu risc înalt, tract biliar, cezariană, histerectomie)	Cefazolină sau clindamicină pentru cap şi gât	Inainte şi în timpul procedurii
-Curate-contaminate (colorectale, apendictomie)	Cefoxitină sau cefotetan (se adaugă neomicină oral plus eritromicină pentru cele colorectale)	Inainte şi în timpul procedurii
-Murdară (viscere rupte)	Cefotixină sau cefotetan-gentamicină (clindamicină + gentamicină) sau alte asocieri active asupra bacteriilor anaerobe şi Gram-negative	Inainte şi timp de 3-5 zile după procedură
-Murdară (plagă traumatică)	Cefazolină	Inainte şi încă 3-5 zile după traumatism

Strategia utilizării antibioticelor

Utilizarea rațională

Cheltuielile prin folosirea agenților antibacterieni reprezintă 20-50% din costurile totale ale medicamentelor. La pacienții ambulatorii, costurile medicamentelor antibacteriene sunt pe locul doi după cele ale medicamentelor aparatului cardiovascular. Pentru 10-14 zile de tratament cu un agent nou, administrat parenteral, cheltuielile ating 1.000-2.000 dolari. In afară de costurile în bani se mai

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

adaugă şi morbiditatea crescută prin efectele adverse şi interacţiunile medicamentoase şi posibil, costurile pentru tratarea infecţiilor cu microorganisme rezistente.

O serie de sugestii intenţionează să ofere o orientare obiectivă în domeniul antibioticelor:

1. Prezentarea obiectivă a calităţilor medicamentelor în publicatii cu prestigiu.
2. Clinicienii să utilizeze cu încrdere medicamentele recomandate de experţi şi să reziste tentaţiei de a folosi un agent antimicrobian cu spectru larg, niveluri tisulare şi timp de înjumătăţire mare, care nu înseamnă neapărat şi eficienţă clinică crescută.
3. Clinicianul trebuie să cunoască profilul local al sensibilităţii bacteriene. Dacă, de exemplu, *Pseudomonas aeruginosa* este sensibil la vechii agenţi, nu trebuie să folosească neapărat antibiotice noi, cu activitate antipseudomoans îmbunătăţită.
4. Terapia empirică cu unul sau mai mulţi agenţi cu spectru larg poate fi frecvent simplificată prin folosirea agenţilor cu spectru îngust sau chiar cu medicamente orale dacă sunt disponibile rezultatele laboratorului privind bacteria izolată şi sensibilitatea acesteia.

Prin urmărirea acestor direcţii, îngrijirea pacienţilor nu va fi compromisă, cheltuielile ar putea fi evitate; iar viaţa medicamentului se va prelungi.

Bibliografie

Bergen T. *Overview of acylureidopenicillin pharmacokinetics.*Scand J Infect Dis, 29:33, 1981.

Finch RG. *Antibacterial chemotherapy*: principles of use. Medicine, 24:24-26, 1996.

Kaiser AB, McGee ZA. *Aminoglycozide therapy of gram-negative bacillary meningitis.* N Engl J Med, 293: 1215, 1975.

Moellering RC. *Antiinfectivfe therapy. Principles of antiinfective therapy.* In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds. Mandell Dl, Douglas RG and Bennett JE. Wiley Medical Publication, New York, 153-156, 1988.

Neu HC. *Aminopenicillins: Clinical pharmacology and use in diseases states.* Int J Clin Pharmacol Biopharm, 11:132, 1975.

Neu HC. *Clinical uses of cephalosporins.* Lancet. 252, 1982.

Pancoast SJ, Jahre JA, Neu HC. *Mezlocillin in the therapy of serious infections.* Am J Med, 67:747, 1979.

Phillips I. *Aminoglycosides.* Lancet 2: 311, 1982.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13

Acțiunea agenților chimici non-antibiotici asupra bacteriilor. Dezinfectante, antiseptice, preservanți

După modul de acțiune asupra celulelor bacteriene, substanțele chimice se grupează în:

a. - substanțe cu acțiune asupra creşterii şi multiplicării;
   - cu acțiune stimulatoare: nutrienți, factori de creştere;
   - cu acțiune antimicrobiană: antiseptice, dezinfectante, chimioterapice şi antibiotice.

b. - substanțe indiferente.

Antiseptice şi dezinfectante

De-a lungul anilor, cercetările empirice sau ştiințifice au dus la stabilirea conceptului de boală transmisibilă de origine microbiană, la descoperirea principalelor căi de transmitere, pătrundere în organism şi de eliminare a microorganismelor. Progresiv au fost elaborate două concepte, cu aplicabilitate practică:

- antisepsia şi antisepticele;
- dezinfecția şi dezinfectantele.

Antisepsia se referă la eradicarea microorganismelor care constituie flora normală a țesuturilor vii (pielea şi mucoasele) şi la evitarea pătrunderii lor în organism sau transmiterea la alte persoane sau în mediu.

Dezinfecția se referă la eradicarea microorganismelor prezente pe materialele medico-chirurgicale şi care pot fi introduse în organism prin utilizarea lor.

Antisepticele sunt substanțe care împiedică creşterea şi multiplicarea bacteriilor, dar nu le omoară (bacteriostatice). Activitatea lor antimicrobiană este asociată cu neafectarea integrității țesuturilor vii.

Dezinfectantele omoară celulele bacteriene (acțiune bactericidă); activitatea antibacteriană a dezinfectantelor nu trebuie asociată cu acțiunea corosivă sau toxică.

Mecanismele de acțiune antimicrobiană

Antisepticele şi dezinfectantele se pot grupa în:

- produşi cu acțiune potențial letală: compuşi chimici foarte reactivi, cu acțiune brutală, rapidă, temporară şi adesea nespecifică (apa oxigenată, halogenii, clorul,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

iodul, oxidul de etilenă, hexamidina, hexetidina, dibromopropamidina, acridinele; compuşi cu acţiune specifică: săruri de amoniu cuaternar, derivaţi fenolici, alţii decât fenolul, clorhexidina, hexamidina, hexetidina, dibromopropamidina, acridine;

- produşi cu acţiune non-letală, dar inhibitori ai creşterii: metalele (mercurul, derivaţii de cupru, zinc, argint), coloranţii.

Ţintele principale de acţiune ale antisepticelor şi dezinfectantelor

Structura peretelui celular al microorganismelor condiţionează accesul spre ţintele de acţiune şi specificitatea de acţiune a agenţilor antimicrobieni.

Au fost descrise cinci mecanisme de acţiune ale agenţilor antimicrobieni:

a. absorbţia la suprafaţa celulei urmată de penetrarea peretelui;
b. reacţii complexe cu membrana citoplasmatică care duc la dezorganizarea acesteia;
c. ieşirea compuşilor cu greutate moleculară mică din citoplasmă;
d. degradarea proteinelor şi acizilor nucleici;
e. liza peretelui cauzată de enzimele autolitice.

Schema peretelui celular la bacterii şi levuri, precum şi principalele ţinte de acţiune sunt prezentate în Fig.13.1.

a. Absorbţia la suprafaţa celulei

Au fost definite cinci profile de absorbţie, dar pentru un număr mic de produse. Prezenţa sarcinilor electro-negative la suprafaţa celulei favorizează fixarea derivaţilor cationici.

b. Acţiunea la nivelul peretelui celular

Peretele bacteriilor Gram-negative este alterat specific (la nivelul membranei externe) de produşii care acţionează şi la nivelul membranei citoplasmatice. Acţiunea unor agenţi chelatori (ex. acidul etilen diaminotetraacetic – EDTA) asupra cationilor care stabilizează membrana, sensibilizează bacteriile Gram-negative la acţiunea altor agenţi antimicrobieni; sensibilitatea bacteriilor Gram-pozitive, a levurilor şi mucegaiurilor nu este însă modificată.

c. Acţiunea asupra membranei citoplasmatice

Membrana citoplasmatică care asigură metabolismul energetic şi răspunde de transportul şi menţinerea metaboliţilor în celulă este ţinta principală de acţiune a antisepticelor şi dezinfectantelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

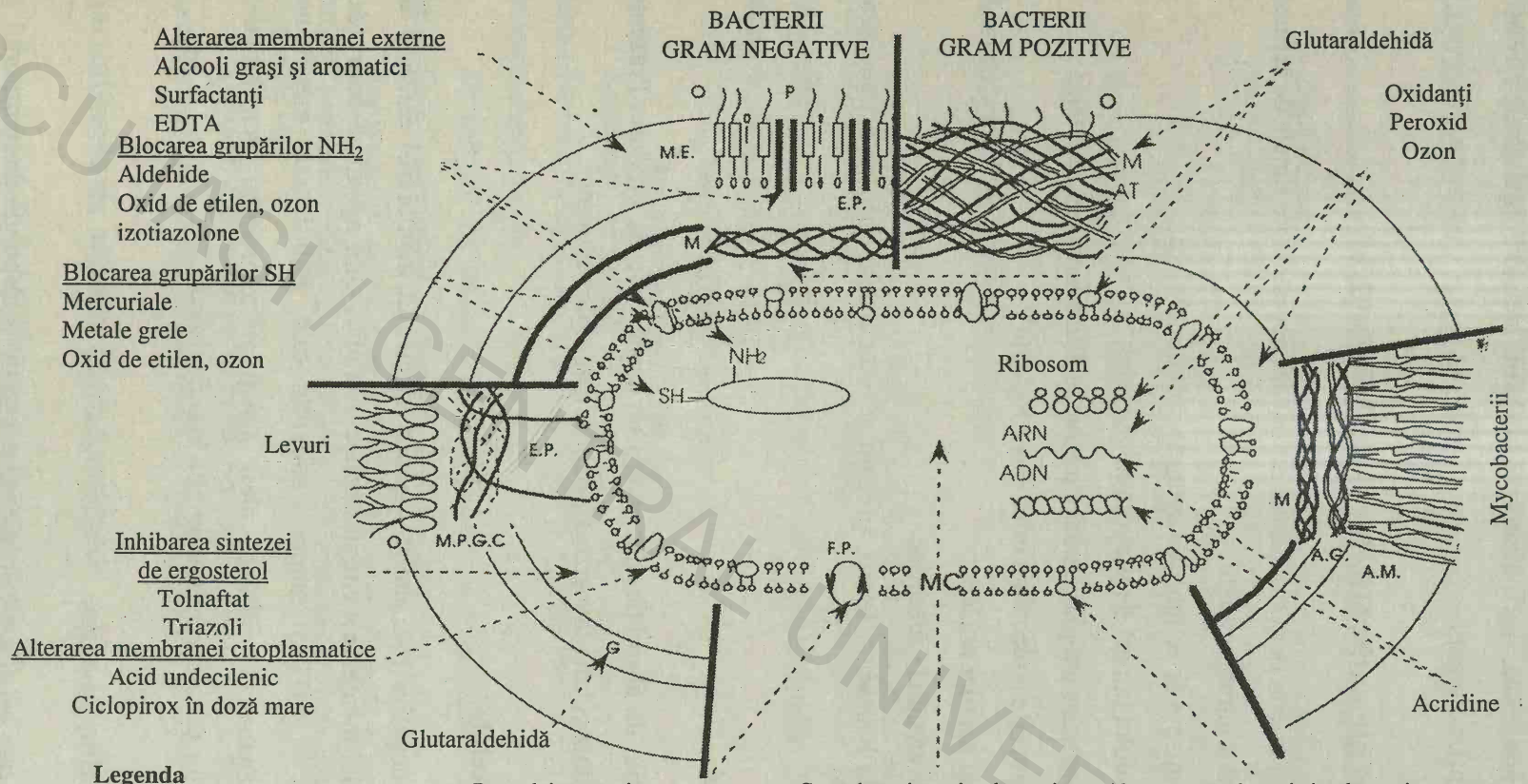


Fig.13.1 Tintele de acţiune ale agenţilor antimicrobieni non-antibiotice

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modificarea permeabilității membranei duce la pierderea constituienților celulari. Primii care se pierd sunt ionii de potasiu, apoi, funcție de dimensiunile leziunilor, acizii aminici, macromoleculele. Dacă agentul antimicrobian nu este prea concentrat şi acțiunea nu este de durată, alterarea membranei citoplasmatice este reversibilă şi dezorganizarea metabolismului duce doar la inhibarea creşterii: bacteriostază sau fungistază.

Unele antiseptice (salicilanilida şi derivații săi de brom, clor) şi dezinfectante fenolice acționează prin inhibarea producerii de energie la nivelul membranei.

Efectul fungistatic al unor compuşi cum ar fi, triazolii (miconazol) şi tolnaftat, se bazează pe inhibarea biosintezei sterolilor (ergosterol), care intră în structura membranei citoplasmatice la fungi şi levuri.

Acțiunea la nivelul citoplasmei

Țintele potențiale, la nivel citoplasmatic asupra cărora acționează agenții antimicrobieni, după ce au trecut de cele două obstacole – peretele celular şi membrana citoplasmatică sunt: citoplasma, enzimele şi în general proteinele citoplasmatice, acizii nucleici, ribosomii.

Nici un studiu nu a evidențiat până în prezent enzima țintă specifică, răspunzătoare de moartea celulei.

Coagularea ireversibilă a constituenților citoplasmatici este o acțiune care intervine în diverse procedee de dezinfecție. Moartea celulei survine rapid, prin denaturarea proteinelor şi acizilor nucleici.

Acțiunea asupra metabolismului şi a enzimelor constă într-o inactivare mai puțin brutală, concretizată prin reacții la nivelul grupărilor tiolice (compuşi de mercur, metalele grele) sau la nivelul altor funcții (hidroxilice, carboxilice, aminice).

Interacțiunea la nivelul acizilor nucleici. Efectul bacteriostatic se pare că este produs de acridine, formaldehidă şi feniletanol.

Interacțiunea cu ribosomii. Ribosomii nu reprezintă ținte specifice pentru agenții non-antibiotici, iar mecanismul disocierii lor, în doi constituienți sub acțiunea peroxidului de hidrogen, clormercuribenzoatului este neelucidat.

Clasificarea principalelor antiseptice şi dezinfectante după modul de acțiune

Agenții antimicrobieni, alții decât antibioticele se pot grupa în două categorii: produşi cu acțiune potențial letală şi produşi cu acțiune nonletală, dar care inhibă creşterea (Tabel 13.1).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 13.1 Spectrul de activitate şi modul de acţiune al principalelor clase de antiseptice şi dezinfectante

Grupe	Exemple	Activitate antimicrobiană		
		Bacterii	Spori bacterieni	Ciuperci
Acridine	Derivaţi de acridină	bacteriostatic	inactiv	?
Alcooli	Etanol Alcooli alifatici (isopropilic) Alcooli aromatici	bactericid	inactiv	fungicid ?
Aldehide	Formaldehidă Glutaraldehidă	bactericid lent bactericid rapid	sporicid lent? sporicid	fungicid? fungicid
Compuşi de amoniu quaternar şi alţi compuşi cationici	amoniu quternar clorura de benzalconiu cetrimid Pirimidium clorura de cetilpirimidium Quinoline diacetat de bisdequaliniu clorura de dequaliniu	Bactericid sau bacteriostatic mai activ asupra bacteriilor Gram-pozitive	inactiv	variabil (fungistatic)
Clorhexidina	Săruri de clorhexidina (digluconat, diacetat)	bactericid sau bacteriostatic	inactiv	lent activ (fungistatic)
Clor Compuşi ai clorului Iod şi compuşi iodaţi	Hipoclorit de sodiu Cloramina, halozon Dicloro-izocianurat de sodiu Iod	bactericid bactericid	sporicid în doză crescută ?	fungicid fungicid
Coloranţi	verde brillant cristal violet verde malachit	bacteriostatic activ asupra bacteriilor Gram-pozitive	inactiv	fungistatic
Mercuriale	thiomersal mercurocrom nitromersal săruri de fenilmercur	bacteriostatic		fungistatic
Oxidanţi	peroxid de hidrogen permanganat de potasiu ozon	bactericid	sporicid	fungicid
Fenol şi derivaţi	Fenoli Cresoli Clorofenoli	Bactericid sau bacteriostatic	Slab activ	Fungicid sau fungistatic
Bis-fenoli şi compuşi înrudiţi	Hexaclorofen Triclosan fenticlor	Bactericid sau bacteriostatic	inactiv	fungistatic

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Produşi cu actiune letală non-specifică

Substanţele oxidante

Peroxidul de hidrogen (apa oxigenată) este foarte toxic pentru toate celulele vii; atacă lipidele membranare, ADN, ribosomii şi alţi compuşi celulari esenţiali.

În celule este degradat sub acţiunea unor enzime (peroxidaza, catalază). Acţionează asupra tuturor bacteriilor, ciupercilor (inclusiv spori, virusuri).

Acidul peracetic este un acid slab, dar un oxidant mai puternic decât apa oxigenată, cu acţiune sporicidă, chiar la temperaturi scăzute. Acţionează asupra legăturilor duble şi distruge funcţia chimio-osmotică a membranei citoplasmatice.

Oxidul de etilen este un agent alchilant care reacţionează cu aminele şi proteinele. Efectul letal este consecinţa formării de esteri cu guanina.

Peroxizii minerali (perborat de sodiu, permanganat de potasiu) au proprietăţi antimicrobiene limitate iar mecanismul lor de acţiune nu este bine precizat.

Ozonul este un oxidant foarte putenic, care reacţionează cu proteinele şi acizii nucleici ai tuturor microorganismelor (inclusiv virusuri). Interacţionează cu compuşii proteici din mediu.

Acizii şi bazele

Acizii şi bazele puternice sunt agenţi corosivi utilizaţi mai rar pentru deinfecţie, care acţionează asupra tuturor microorganismelor prin denaturarea nespecifică, ireversibilă a proteinelor. (ex. fenolul). Acizii graşi (ex. acidul undecilenic) destabilizează membrana citoplasmatică şi au acţiune fungistatică sau fungicidă în concentraţii mari.

Aldehidele

Formaldehida şi formolul (soluţie 40% formaldehida) au o acţiune foarte lentă şi efectele letale par a fi asociate cu alchidarea acizilor nucleici. Formaldehida reacţionează cu guanidina din acizii nucleici. Alchilarea duce la formarea de punţi metilen stabile între bazele purinice şi pirimidinice. Formolul nu este corosiv dar vaporii sunt toxici şi utilizarea lui este limitată din cauza proprietăţilor potenţial cancerigene.

Glutaraldehida, utilizată iniţial ca tanin pentru piele, din 1962, datorită acţiunii alchilante a fost considerată agent antimicrobian. În mediu alcalin, poate polimeriza, cu reducerea activităţii.

Pentru a pătrunde în celulă, are loc o interacţiune cu peptidele de la suprafaţă, mai ales cu grupările – HN_2 libere ale peptidoglicanului. Pătrunderea în celulă duce la interacţiunea grupărilor

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

aldehidice cu proteinele membranei, cu blocarea transportului de metaboliți și oprirea sintezei de macromolecule. Porinele membranei externe a bacteriilor Gram-negative sunt alterate și se reduce astfel pătrunderea substanțelor.

Prin inhibarea enzimelor celulare, este posibil ca glutaraldehida să fie cauza letalității rapide a celulelor. Pe lângă efectul antimicrobian, reacția cu proteinele de la suprafața celulară duce la aglutinarea celulelor.

Halogenii și derivații acestora

Derivații clorului au un mod de acțiune mai puțin cunoscut. Acționează la nivelul enzimelor din peretele și membrana celulară și la nivelul citoplasmei prin denaturarea proteinelor și inactivarea acizilor nucleici.

În cazul sporilor, clorul și derivații acestuia modifică permeabilitatea tunicilor și pătrunderea ionilor de clor.

Iodul are de asemenea un mecanism de acțiune mai puțin elucidat. Trece rapid prin peretele celular și distruge proteinele citoplasmatice și acizii nucleici. Iodul are proprietăți oxidante; *Staphylococcus aureus*, care posedă sisteme enzimatice cu proprietăți reducătoare, la nivelul peretelui, reduce I_2 în iodură și ca urmare, timpul de acțiune letală a iodului este prelungit.

Iodul reacționează cu funcțiile aminice ale aminoacizilor și bazelor, cu formare de derivați N iodați; cea mai importantă acțiune este oxidarea grupărilor SH și ca urmare blocarea funcționării anumitor proteine. Compușii iodului cu detergenții anionici, cationici sau neionici (iodofori) au acțiune bactericidă și fungicidă, cu eliberearea lentă a iodului.

Compuși cu acțiune letală specifică

Compușii de amoniu cuaternar se absorb ușor datorită prezenței sarcinilor negative prezente la suprafața strucutrilor celulare. Ținta specifică este membrana citoplasmatică. Acțiunea letală depinde de factori care condiționează intensitatea sa: concentrația produsului, natura microorganismului și numărul de celule, timpul de contact, temperatura, pH-ul mediului, prezența unor substanțe cu care interferă. În concentrații mari, compușii de amoniu cuaternar denaturează proteinele și enzimele.

Agenții tensioactivi non-cationici (săpunuri) sunt încărcați negativ și acționează la nivelul membranei citoplasmatice, probabil, într-o succesiune de etape:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- absorbția și trecerea prin perete (cu posibilitatea de alterare a membranei externe la bacteriile Gram-negative;
- pătrunderea prin membrana citoplasmatică;
- alterarea permeabilității membranare și a echilibrului osmotic;
- alterearea organizării moleculare a stratului lipidic.

Alcoolii

Modul de acțiune al alcoolilor este puțin cunoscut, încât denaturarea proteinelor este în mod curent admisă.

Denaturarea are loc numai în prezența apei ceea ce explică de ce alcoolul absolut este mai puțin bactericid decât amestecul apă-alcool.

Alcoolul distruge dehidrogenazele de la *Escherichia coli* și poate astfel inhiba producerea unor metaboliți esențiali pentru diviziunea celulei. Acționează asupra morfologiei și membranelor celulare și în general este mai activ asupra bacteriilor Gram-negative decât Gram-pozitive.

Alcoolii superiori (propilic, butilic) au activitate antimicrobiană care crește concomitent cu greutatea moleculară dar solubilitatea lor în apă scade, fapt care le limitează utilizarea.

Clorhexidina

În concentrații scăzute, clorhexidina este bacteriostatică, iar în doze mari, bactericidă. Clorhexidina, sub formă cationică se asociază cu grupările negative fosfat din lipopolizaharide și cu grupările carboxil ale proteinelor de la suprafața celulei bacteriene.

Prezența fosfolipidelor membranare favorizează pătrunderea moleculelor în celulă. În concentrație mică, clorhexidina alterează membrana citoplasmatică prin dezorganizarea lipidelor și pierderea din celulă a componenților citoplasmatici cu greutate moleculară mică. Concentrațiile mari duc la precipitarea și cuagularea citoplasmei. În concentrații subbacteriostatice, clorhexidina inhibă activitatea dehidrogenazei.

Fenolii

Compușii fenolici pot inactiva bacteriile prin trei mecanisme:

a. producerea de leziuni la nivelul membranei;
b. denaturarea proteinelor;
c. inactivarea enzimatică.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Modificarea permeabilității celulare duce la eliberarea constituenților citoplasmatici, începând cu ionii de potasiu. Hexaclorofenul determină pierderea materialului intracitoplasmatic cu efect maxim la o concentrație de aproximativ 7 ori concentrația minimă letală.

De asemenea, inhibă lanțul de transport al electronilor şi ca urmare, toate activitățile metabolice ale bacteriilor aerobe.

b. Fenolii (ex. tymolul) în concentrații ridicate, au acțiune bactericidă rapidă: traversează peretele şi denaturează proteinele bacteriene.

c. Inactivarea enzimatică poate fi selectivă funcție de concentrație. Astfel, în concentrație scăzută, fenolul inactivează parțial dehidrogenaza, oxidaza şi catalaza; oxidaza este complet inactivată la concentrații de 0,15% iar în concentrație de 1,2% (concentrația letală) inactivează complet şi dehidrogenaza; catalaza este inactivată la concentrații de 38%.

Anilidele

Salicilanilidele şi carbanilidele au grade diferite de absorbție, datorită deosebirilor structurale între cele două grupe.

Tetraclorsalicilanida (TCS) diminuează fixarea fosfatazei şi pierderea unor acizi aminați (alanina şi acidul glutamic).

Carbanilidele acționează tot la nivelul membranei celulare prin modificarea gradientului de pH transmembranar.

Produşi cu acțiune specifică dar non letală

Sărurile de mercur

Clorurile mercurice şi organo-mercurialele (săruri de fenilmercur, mercurotiolat, mercurobutol) acționează în concentrații mici, asupra grupelor tiolice ale proteinelor. Acțiunea lor este reversibilă în prezența unui exces de grupe –SH, derivații de mercur fiind inhibitori ai creşterii, fără efect letal.

Sărurile altor metale grele

Sărurile de argint sunt foarte active în mediu biologic dar prezența clorurilor determină precipitarea lor imediată. Compuşii de argint alterează membrana citoplasmatică şi interacționează cu ADN. La *Escherichia coli*, ionii de Ag^+ inhibă funcționarea lanțului respirator.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sărurile de cupru şi zinc

Mecanismul lor de acţiune este mai puţin cunoscut. Se pare că efectul toxic al cuprului şi zincului este asociat cu oxidarea unei enzime sau a unui metabolit esenţial.

Acridinele

Derivaţii de acridină (proflavină, acriflavina, diflavina), ionizaţi în formă cationică, reacţionează cu ionii de hidrogen dintr-un situs anionic al celulei care este blocat şi nu-şi mai poate manifesta funcţia normală.

Coloranţii

Unii coloranţi au acţiune bacteriostatică fiind utilizaţi ca antiseptice locale. Verdele malachit inhibă creşterea bacteriană şi este totodată un constituent al mediului de izolare pentru mycobacterii. Violetul de genţiana inhibă biosinteza peptidoglicanului. Verdele malachit, verdele brilliant şi violetul de genţiana, în mediu alcalin, formează o pseudobază care datorită solubilităţii în lipide, trece uşor prin membrana citoplasmatică şi reacţionează cu acizii nucleici.

Mecanismele de acţiune ale antisepticelor şi dezinfectantelor asupra virusurilor

Evoluţia tehnicilor medicale a dus la utilizarea de materiale plastice care nu suportă metode termice de sterilizare, care să distrugă bacteriile şi virusurile, încât a fost necesară diversificarea metodelor de decontaminare, mai ales prin mijloace chimice.

Lupta contra transmiterii virusurilor a început cu adevărat din momentul în care au fost evidenţiate consecinţele colective ale pericolului transmiterii pe cale sanguină a virusurilor.

Anumite caractere structurale şi fizico-chimice ale virusurilor determină proprietăţile de labilitate sau rezistenţă (Tabel 13.2 şi Tabel 13.3).

Virusurile se grupează în două mari categorii funcţie de prezenţa sau absenţa anvelopei care îmbracă capsida. În mediul exterior, virusurile cu anvelopă sunt fragile (excepţie fac Poxvirusurile şi virusul hepatitei B) iar virusurile fără anvelopă sunt rezistente.

După multiplicarea intracelulară, anvelopa virală este produsă în dependenţă de sistemul membranar celular intern sau extern, astfel încât lipidele acestor membrane se regăsesc în proporţie de 20-35% în anvelopă. Solubilitatea acestor lipide într-un mare număr de dezinfectanţi uzuali (mai ales alcooli) reflecă caracterul labil al anvelopei.

Pentru majoritatea virusurilor, receptorii care asigură absorbţia în celula gazdă sunt situaţi pe anvelopă, iar prezenţa dezinfectantelor le "inactivează".

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 13.2 Acțiunea dezinfectantelor asupra virusurilor cu anvelopă

Familia	Nume comun	Proprietăți fizico-chimice
Poxviridae	Vaccina Molluscum contagiosum	Rezistență la eter ?
Herpesviridae	Herpes simplex 1, 2 Varicella – Zona Cytomegalovirus Virus Epstein-Barr	?
Hepadnaviridae	Hepatita B	Instabilitate la pH acid. Infectivitate conservată 6 luni la 30^0C şi 10 h la 60^0C
Togaviridae	Rubeola Febra galbenă Hepatita C Alfavirus	Sensibilitate la cloroform
Coronaviridae	Coronavirus	
Paramyxoviridae	Parainfluenza 1-4 Oreion Rujeolă Virus respirator sincițial	Sensibilitate la detergenți neionici, la formaldehidă, oxidanți
Ortomyxoviridae	Gripa	Inactivat în câteva minute la pH5. Inactivat de formaldehidă, β-propiolactonă, UV, radiații gamma
Rhabdoviridae	Rabia	Stabil la pH5-10. Inactivat la 56^0C în câteva minute, UV, radiații gamma.
Bunyaviridae	Hantaan Febra hemoragică de Coreea	?
Arenaviridae	Coriomeningita limfocitară Febra de Lassa	Inactivat în câteva minute la pH<5,5 sau >8,5, la 56^0C, UV, raze gamma
Filoviridae	Marburg, Ebola	Sabil la 20^0C, inactivat în 30 minute la 60^0C
Retroviridae	HIV 1-2	Inactivat de detergenți, parțial de enzime proteolitice, relativ rezistent la UV

Tabel 13.3. Acțiunea dezinfectantelor şi a unor factori fizici asupra virusurilor fără anvelopă (nude)

Familia	Nume comun	Proprietăți fizico-chimice
Adenoviridae	Adenovirus	
Papovaviridae	Papilloma Vieruci Condylomes Polyoma	Stabilitate relativă la pH acid, căldură ?
Parvoviridae	Parvovirus	Stabil la pH 3-9, la 56^0C 1h
Reoviridae	Rotavirus	Stabil la pH3, relativ stabil la căldură
Caliciviridae	(diaree)	Inactivat la pH5, prezența Mg^{++} accelerează inacxtivarea
Picornaviridae	Enterovirus Hepatita A Rhinovirus	Stabil la pH 3-9 Mg^{++} şi Ca^{++} cresc stabilitatea la 56^0C Coloranții (roşu neutru, proflavina) induc fotoinactivare Inactivat la pH<5

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

Mecanismele de inactivare a virusurilor

Dezinfectantele par a interfera cu structurile virale după mai multe mecanisme:

- alterarea unui situs indispensabil sau nu pentru fixarea virusului pe celulă;
- absorbția dezinfectantului pe receptorii virali urmată de "neutralizarea" virusului sau schimbări în conformația proteinelor capsidei;
- distrugerea capsidei cu eliberarea în mediul exterior a acidului nucleic, potențial infecțios;
- denaturarea acidului nucleic conservat într-o capsidă intactă.

Alterarea receptorilor virali are ca rezultat imposibilitatea virusului de a infecta celula gazdă, atâta timp cât acesta nu găseşte în mediul exterior nici o posibilitate de a-şi reface receptorii deficitari.

Absorbția dezinfectantelor pe virus. Formaldehida, în concentrație scăzută şi după un timp de contact scurt, se absoarbe pe capsida virusurilor nude (enterovirusuri) fără a le denatura şi aceasta este un prim stadiu al inactivării, reversibil, dacă se elimină dezinfectantul. Produsul pătrunde în capsidă şi inactivarea completă durează mai multe zile.

Distrugerea capsidei cu eliberarea de acid nucleic infecțios a fost pusă în evidență la microscopul electronic, dar nu s-a elucidat problema infectivității acidului nucleic eliberat în mediul extern.

Sunt puține virusuri (ex. poliovirusurile) al căror genom izolat este infecțios: acestea conțin ARN monocatenar, care are rol şi de ARNm.

Acizii nucleici denaturați şi capsida intactă. Prin acest mecanism se conservă capacitatea de penetrare în celula gazdă, fără ca virusul să se poată replica.

Pentru anumite virusuri cu anvelopă, penetrarea poate antrena încorporarea de glicoproteine virale în membrana celulară, chiar în absența replicării genomului, ceea ce duce la o reacție limfocitară de distrugere a celulei purtătoare de semnale "străine".

Factori care influențează inactivarea virusurilor

Utilizarea în practică a diferitelor procedee de dezinfecție este corelată cu o cunoaştere a factorilor care influențează procesul de inactivare a unei populații virale:

- tipul de virus;
- numărul de doze infectante prezente inițial;
- timpul de contact între dezinfectant şi virus;
- concentrația produsului activ disponibil;

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- pH-ul mediului în care are loc inactivarea virusului;
- temperatura;
- starea de agregare a particulelor virale;
- prezența particulelor interferente.

Tipul de virus: prezența sau absența anvelopei este un criteriu de bază în evaluarea dificultății de a inactiva populația virală.

Numărul de doze infecțioase inițial prezente. Pentru un timp dat, contactul virus-dezinfectant, reduce numărul particulelor infecțioase virale, cu un procent identic, indiferent de numărul inițial. Dacă titrul inițial este mare şi titrul rezidual va fi ridicat. Încărcătura virală inițială în general nu este cunoscută şi de aceea este necesară reducerea semnificativă înainte de a pune în contact virusul cu dezinfectantul. Aceasta se realizează prin spălarea mâinilor sau a obiectelor, prin care se reduce nu numai încărcarea virală inițială cât şi substanțele interferente.

Timpul de contact. Dezinfectantele eficiente inactivează în câteva minute virusurile cu anvelopă.

Virusurile nude necesită un timp de contact de 30-60 minute sau mai mult uneori. Deci metodele de contaminare a materialelor medicale, care vizează distrugerea bacteriilor (cu excepția mycobacteriilor) sunt eficiente şi asupra virusurilor cu anvelopă, dar pot fi inactive asupra virusurilor nude.

Timpul de contact este determinat de obiectul dezinfecției: decontaminarea mâinilor, decontaminarea rapidă a materialului de consultație, decontaminarea finală a materialului la sfârşitul zilei.

Timpul şi concentrația sunt invers proporționale dacă se reduce timpul, trebuie crescută concentrația.

Concentrația produsului activ disponibil depinde de condițiile de utilizare şi capacitatea de a fi captat de substanțele interferente. Toxicitatea limitează utilizarea în practică a concentrațiilor ridicate.

pH-ul intervine atât asupra virusului cât şi a dezinfectantului. Creşterea activității unui produs este influențată de pH: astfel, alcalinizarea glutaraldehidei creşte semnificativ activitatea acesteia.

Temperatura optimizează acțiunea dezinfectantelor (compuşi fenolici, formol, hipoclorit de sodiu, etc). Anvelopele şi capsidele virale sunt denaturate la 55-60^{0}C, în câteva minute, cu excepția virusului hepatitei B. Virusurile din grupele *Parvoviridae, Roeviridae şi Papovaviridae* parazite au o stabilitate intermediară.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Agregarea virusurilor este un fenomen care priveşte virusurile nude, la care modificările încărcării electrice de suprafață dau tendința de agregare. Particulele virale aflate în centrul unei agregări sunt protejate de acțiunea dezinfectantului şi dezagregarea ulterioară poate elibera particule infecțioase. Agregarea depinde de conținutul ionic ale mediului în care sunt suspendate particulele virale: pH-ul cu valori extreme, hipertonia sau hipotonia mediului, prezența anumitor ioni (Al^{++}, Ca^{++}) sunt factori favorizanți. Prezența proteinelor virale şi isotonia asigură menținerea populației virale în faza dispersată.

Substanțele interferente pot influența inactivarea virusurilor, fie prin captarea unei fracțiuni a dezinfectantului (hipoclorit de sodiu, detergenți), fie prin modificarea stabilității particulelor virale.

Proteinele, diferitele materii organice, "protejează" particulele virale, ceea ce explică probabil supraviețuirea îndelungată a virusurilor în sânge sau fecale.

Activitatea dezinfectantelor şi antisepticelor uzuale asupra diferitelor grupe de virusuri

Anumite produse confirmă activitatea lor eficientă (produşi halogenați, alcooli, aldehide), (Tabel 13.4).

Tabel 13.4 Activitatea dezinfectantelor şi antisepticelor uzuale asupra unor virusuri care se transmit în spital

Virus	Produs – timp de contact
Hepatita B	- compuşi de amoniu quternar – 10 min - fenoli – 10 min - izopropanol 70^0 – 10 min - etanol 90^0 – 5 min - hipoclorit de sodiu – 10 min - glutaraldehida 1% - 5 min
Imunodeficiența umană	- etanol 50^0 – 10 min; 99^0 – 5 min - săruri de amoniu quaternar 0,1% - 30 min - peroxid de hidrogen 0,3% - 10 min; 6% - 3 min - NaOH 30 nmoli/l – 5 min - hipoclorit de sodiu – 10 min - glutaraldehida 1% - 30 min - betaina (1% iod activ) - câteva minute
Rotavirus	- betaina (1% iod activ) – 1 min - etanol 70^0 – 30 min - formaldehida 3% - 30 min

Printre virusurile cu transmitere sanguină, virusul imunofedicienței umane prezintă sensibilitatea specifică unui virus cu anvelopă; virusul hepatitei B, conform unor studii efectuate pe

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cimpanzeu, este sensibil la acţiunea compuşilor cationici de amoniu cuaternar (ex. clorura de benzalconium). Rotavirusurile, care se transmit prin fecale sunt sensibile la etanol, care este propus pentru decontaminarea endoscoapelor şi a mâinilor. Alte virusuri enterice, cum ar fi Enterovirus, nu sunt sensibile la etanol.

Problema decontaminării virale este încă departe de a fi rezolvată în toate cazurile:

- Industria producătoare de aparatură medicală, mai ales sisteme optice, trebuie să propună materiale mai rezistente la acţiunea dezinfectantelor sau a căldurii.
- Utilizarea implanturilor depăşeşte strategia actuală de protecţie contra virusurilor şi utilizarea de dezinfectante cunoscute în prezent nu este suficientă pentru a rezolva problema transmiterii.
- Riscul poluării impune modificarea şi utilizarea produselor chimice care intră în compoziţia dezinfectantelor. Ecologiştii deja sunt împotriva utilizării produşilor pe bază de clor.
- Apare necesară revenirea la metodele fizico-chimice, mai ales la temperatură, (60-65^{0}C) care are avantajul de a inactiva numeroase virusuri, permiţând reducerea concentraţiei dezinfectantelor. Gazele, plasma şi radiaţiile utilizate pentru decontaminarea bacteriană necesită instalaţii costisitoare şi evaluarea activităţii antivirale nu este suficient de cunoscută pentru a putea face o apreciere reală a eficienţei lor.

Mecanisme de acţiune asupra prionilor

Un număr mic de metode fizico-chimice sunt utile pentru inactivarea prionilor (Tabel 13.5).

Tabel 13.5 Sensibilitatea prionilor la procedeele uzuale de inactivare

Inactivat de:	
- hipoclorit de sodiu (2% clor liber)	- NaOH 1N
- uree 8M	- căldură umedă
- fenol	
Fără acţiune:	
- solvenţi organici	- iodofori
- alcooli (etanol, metanol)	- acid peracetic
- oxidul de etilen	- β-propiolactona
- formol	- raza UV
- glutaraldehidă	- ultrasunete
- peroxidul de hidrogen (H_2O_2)	

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceşti agenţi patogeni pun numeroase probleme nerezolvate încă:

- procedeele de decontaminare a materialelor de uz medical sunt puţine şi necontrolabile, datorită lipsei unei metodologii adecvate;
- carenţele tehnice fac imposibilă depistarea subiecţilor infectaţi, furnizori potenţiali de organe pentru transplant;
- transmiterea interspeficică posibilă impune precauţii privind contactul frecvent între om şi animalele din mediul apropiat sau pe care le utilizează în alimentaţie.

Rezistenţa microbiană la acţiunea antisepticelor şi dezinfectantelor

Microorganismele au o capacitate de adaptare considerabilă, dintre care cea mai spectaculoasă priveşte agenţii antimicrobieni (dezinfectante, antiseptice, antibiotice).

Sensibilitatea şi rezistenţa microbiană sunt două noţiuni bazate pe evantaiul de răspunsuri al diferitelor specii sau tulpini la agenţii antimicrobieni. Răspunsul este determinat de condiţii precise: pH, temperatură, prezenţa de substanţe organice sau ioni, modul de creştere al microorganismelor, condiţii care pot modifica esenţial activitatea antisepticelor şi dezinfectantelor.

La modul general răspunsul microorganismului la un agent antimicrobian este definit prin două valori:

- Concentraţia minimă inhibitorie (CMI): cea mai mică concentraţie a unui produs care inhibă total în 18-24 ore multiplicarea unui microorganism;
- Concentraţia minimă letală (CML): cea mai mică concentratie a unui produs care omoară într-un timp determinat un anumit număr de microorganisme.

O populaţie microbiană este rezistentă la un antiseptic sau dezinfectant când CML sau CMI a acestui produs faţă de populaţia considerată este semnificativ mai ridicată decât CML sau CMI a acestui produs faţă de majoritatea populaţiilor microbiene.

Se au în vedere două niveluri ale intensităţii rezistenţei microbiene: nivelul scăzut de rezistenţă care corespunde unor CML inferioare concentraţiei de utilizare a acestui produs şi nivelul ridicat de rezistenţă care corespunde unor CML superioare concentraţiei stabilite pentru utilizare.

În cazul antisepticelor şi dezinfectantelor CML este specifică fiecărui tip de microorganisme.

Pentru bacterii, concentraţia minimă bactericidă (CMB) este definită conform AFNOR (Association Française de Normalisation, 1989) ca cea mai mică concentraţie a unui produs care omoară in vitro (în condiţii strict standardizate) în 5 minute 10^5 bacterii per ml dintr-o populaţie care conţine 10^8 celule/ml.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezistența intrinsecă sau naturală

Se disting două tipuri de rezistență microbiană la agenții antimicrobieni: rezistența intrinsecă și rezistența dobândită.

Rezistența naturală este caracteristică unor specii sau grupe de specii. Ea diferă de rezistența dobândită care apare brusc și într-un mod imprevizibil când o tulpină inițial sensibilă devine rezistentă și este selecționată de agenții antimicrobieni.

Rezistența intrinsecă este previzibilă și este o caracteristică a unei specii față de un agent antimicrobian. Aceasta permite definirea spectrului de activitate al unui produs sau grupe de produse față de speciile natural sensibile și natural rezistente (Tabel 13.6).

Tabel 13.6 Spectrul de activitate a diferitelor antiseptice și dezinfectante.

	Bacterii Gram		Mycobacterii	Spori bacterieni	Levuri sau ciuperci	Virusuri
	pozitive	negative				
Alcool 70⁰	++	++	++	0	+	+
Aldehide	+++	+++	++	+	+++	++
Amonium quaternar	+++	+	0	0	+	+
Carbanilide	+	0	NP	NP	0	NP
Clorhexidina	+++	++	0	0	+	+
Clor	+++	+++	++	++	++	++
Hexaclorofen	+++	+	0	0	+	0
Iod	+++	+++	++	++	++	++
Derivați de mercur	++	++	0	0	+	+
Fenoli	Activitate variabilă funcție de compus					

Legendă: Activitate letală puternică: +++; medie: ++; slabă: +; nulă: 0; neprecizată: NP.

Rezistența intrinsecă a microorganismelor este corelată cu tipul de structură de suprafață a celulei. Prezența unei anvelope externe (bacterii Gram-negative) conferă rezistență mai mare comparativ cu bacteriile Gram-pozitive care nu posedă această membrană.

Mycobacteriile care posedă un strat de ceruri în pretele extern, au o rezistență deosebită. În cadrul aceluiași grup structural, variațiile pot fi importante: astfel, între bacilii Gram-negativi, *Pseudomonas aeruginosa* este mai rezistent natural decât majoritatea enterobacteriilor; *Klebsiella pneumoniae* este mai puțin sensibilă la hexetidin și clorhexetidin comparativ cu *Escherichia coli* (Tabel 13.7).

Contrar bacteriilor, virusurile nude (lipsite de membrana externă) sunt natural mai rezistente la antisepticele și dezinfectante decât virusurile cu anvelopă. De fapt, anvelopa virală este constituită aproape integral din membrana citoplasmatică a celulei în care particula virală s-a maturat și această membrană este ușor distrusă sau dezorganizată de antiseptice și dezinfectante.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 13.7 Activitatea in vitro pentru unele antiseptice şi dezinfectante asupra unor tulpini bacteriene

	Staphylococcus aureus	*Pseudomonas aeruginosa*	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*
Alcool feniletilic	1250	2500 – 5000	2500	2500
Clorocresol	625	1250	1250	625
0-fenilfenol	100	1000	500	500
Hexaclorofen	0,5	250	12,5	12,5
Triclosan	0,1	>300	5	5
Hexetidina	0,4 – 12,5	100 – 300	64 – 425	>10 000
Clorhexidina	0,5 – 1	5 – 60	1	5 – 10
Clorură de benzalconiu	0,5	250	32	32
Cetrimid	4	64 – 128	16	16
Thiomersal	0,2	8	4	4
Nitrat de fenil mercur	0,1	1 - 5	0,5	0,5

Mecanismele de rezistenţă intrinsecă

Ţinta preferenţială de acţiune a antisepticelor şi dezinfectantelor este membrana citoplasmatică.

Alterarea sau distrugerea membranei duce la pierderea constituenţilor vitali din celulă.

De asemenea sunt inactivate numeroase enzime membranare şi ca urmare sunt inhibate şi activităţile metabolice în care intervin, mai ales metabolismul respirator. Membrana citoplasmatică are aceeaşi sensibilitate la antiseptice şi dezinfectante fie că este vorba de bacterii Gram-pozitive sau Gram-negative. Rezistenţa intrinsecă este asociată cu gradul de protecţie al membranei citoplasmatice în bacterie.

La bacteriile Gram-pozitive produşii se fixează pe stratul de peptidoglican de care membrana citoplasmatică este intim legată. La bacteriile Gram-negative membrana citoplasmatică nu este legată de peptidoglican şi în plus, mai există şi stratul extern, care conţine fosfolipide şi mai ales proteine şi lipopolisaharide (LPS), cu rol de ecran protector.

Moleculele hidrofobe reacţionează cu lipidele şi LPS iar moleculele hidrofile depind de porine care sunt indispensabile pentru a traversa membrana. La tulpinile rezistente aceste mecanisme sunt afectate sau total inhibate. Aşadar, anvelopa externă este o barieră de permeabilitate în care LPS şi prezenţa canalelor porinelor sunt elemente predominante.

Rezistenţa dobândită

Rezistenţa dobândită este dată de un eveniment imprevizibil care, în cadrul unei specii cu sensibilitate omogenă la un agent antimicrobian, duce la apariţia unei tulpini (sau

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu sensibilitate diminuată. Când concentrația produsului activ asupra tulpinii devenite rezistente este superioară celor obişnuit utilizate, această tulpină poate fi selecționată.

Rezistența dobândită este urmarea unor variații genetice care se traduc prin modificări biochimice ale celulei şi au drept consecință diminuarea sensibilității.

Acest tip de rezistență are la bază mecanisme genetice (la nivelul cromosomului sau la nivelul plasmidelor – rezistență extracromosomală) şi un mecanism biochimic.

Rezistența dobândită cromosomală la antiseptice şi dezinfectante

Rezistența dobândită cromosomală este spontană şi constă în apariția unei modificări stabile ereditare, a unei gene; produsul genei mutate este el însuşi modificat. Mutația are loc pe genele structurale ale celulei care codifică fie un element al țintei fie un element de fixare sau de permeabilitate a produsului. În majoritatea cazurilor rezistența dobândită este dată de modificarea membranei externe la bacteriile Gram-negative.

Mecanismul biochimic al rezistenței biochimice are ca bază principală modificarea membranei celulare externe care împiedică fixarea sau penetrarea produsului. Compoziția membranei externe a mutantului este diferită de a tulpinii sălbatice; astfel, mutanții de *Serratia marcenscens* rezistenți la clorura de benzalconium, au în membrana externă 30% lipide neutre, față de 5% cât este normal pentru această specie. Excesul împiedică fixarea produsului. Rezistența la clorhexidina este asociată la mutanții de *Pseudomonas aeruginosa* cu diminuarea semnificativă a grupărilor fosfat de pe suprafața lor.

Rezistența dobândită extracromosomală la antiseptice şi dezinfectante

Tulpinile bacteriene care au dobândit rezistența extracromosomală posedă plasmide R (factori de rezistență). Rezistența plasmidică este infecțioasă (plasmidele se transmit de la o bacterie la alta prin procesul de transfer) şi multiplă (numeroase gene care conferă fiecare rezistentă la un tip de agent microbian, sunt purtate pe aceeaşi plasmidă).

Au fost descrise puține gene şi plasmide implicate în rezistența bacteriană la antiseptice şi dezinfectante.

Mai bine studiate sunt genele *qac* şi plasmidele din familia *psk 1*, prezente la *Staphylococcus aureus* şi *Staphylococcus epidermidis* şi genele *m e r*.

Genele qac sunt prezente la stafilococii multirezistenți (MRSA) sau la *Staphylococcus epidermidis*. Au fost identificate patru gene qac: *qac A, qac B, qac C, qac D*, care conferă rezistența maturat şi ace[illegible]moniu quaternar şi la alte produse.

IOSUD UASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Genele qac A şi qac B conferă rezistenţă de înalt nivel la compuşii de amoniu quaternar, agenţi intercalanţi şi coloranţi. Gena qac A este responsabilă şi de rezistenţa la clorhexidină. Genele qac C şi qac D, considerate identice, conferă rezistenţă la nivel mai scăzut faţă de compuşii de amoniu quaternar şi bromura de etidium.

Genele mer. La bacteriile Gram-negative, genele de rezistenţă la mercur sunt organizate în operonul mer care cuprinde gene de reglare *mer R* şi gene *mer TP* care codifică transportul mercurului prin membrană şi gene mer A care produc o reductază NADPH dependentă, capabilă să reducă Hg^{++} în formă metalică volatilă Hg^{0} inofensivă pentru bacterie. Alte gene adiţionale, mer B care codifică o enzimă inductibilă, ornagomercuric – liază, ce rupe legăturile carbon – mercur, în cazul compuşilor organici de mercur, poate completa ansamblul.

Şi la bacteriile Gram-pozitive rezistenţa plasmidică la mercur este frecventă. Plasmidul cuprinde o regiune mer A care cofidică o reductază, o regiune mer B care codifică o enzimă organomercuric-liază şi gene de reglare mer R.

Aspectul epidemiologic al rezistenţei la antiseptice şi dezinfectante

Rezumativ, datele actuale privind rezistenţa plasmidică la antiseptice şi dezinfectante sunt prezentate în Tabel 13.8.

Tabel 13.8 Rezistenţa plasmidică la antiseptice şi dezinfectante

Familia	Bacteria	Mecanisme genetice şi biochimice
Compuşii de amoniu quaternar	*S. aureus* *Staphylococcus spp.* *Escherichia coli* *K. pneumoniae*	gene qac plasmide psk eflux crescut
Fenoli Hexaclorofen	*P. aeruginosa* *Escherichia coli* *Salmonella spp.* *S. aureus*	plasmide PMG-1 şi PMG-2 modificări de suprafaţă
Biguanidine Clorhexidina	*Pseudomonas* *S. aureus*	gene qac plasmide psk eflux crescut
Coloranţi - Săruri de acridină - Bromură de etidium	*S. aureus*	gene qac plasmide psk eflux crescut
Amidine	*S. aureus*	gene qac plasmide psk eflux crescut
Aldehide Formol	*Serratia marcenscens*	dehidrogenaza

Rezistența plasmidică a fost pusă în evidență mai ales la tulpini de *Staphylococcus aureus*, enterobacterii și *Pseudomonas aeruginosa*, responsabile de infecții nosocomiale.

La aceste bacterii, genele de rezistență sunt asociate, pe același plasmid, cu gene de rezistență la antibiotice, existând riscul selecției de tulpini cu rezistență încrucișată, fie prin utilizarea unor antiseptice sau dezinfectante, fie a unor antibiotice față de care sunt rezistente.

Rezistența la derivații de argint. Tulpini rezistente la nitratul de argint au fost izolate în secțiile de arși unde compusul este utilizat pentru a preveni infecțiile. Bacteriile rezistente posedă plasmide R autotransferabile care poartă gene de rezistență la argint, la alte metale grele ca și la diferite antibiotice. La bacilii Gram-negativi, rezistența la derivații de argint a fost descrisă la *Escherichia coli, Salmonella spp., Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa.*

Rezistența la alte metale grele

Rezistența la cadmium a fost observată la *S. aureus* încă din 1970 și este determinată de genele plasmidice *cad A* și *cad B*; mecanismul constă într-un eflux crescut de cadmium.

Rezistența la arseniu și antimoniu, evidențiată la *S. aureus* este asociată cu plasmidele care codifică producerea de penicilinaze și poartă gene de rezistență la mai multe metale grele: plumb, cadmium, zinc, bismut, mercur. La bacilii Gram-negativi nu a fost constată această multirezistență: rezistența se referă doar la sărurile de arseniu și antimoniu. Principalele exemple de rezistență plasmidică la metalele grele sunt prezentate în Tabelul 13.9.

Trebuie menționat că tulpini de *Escherichia coli* rezistente la cupru au fost izolate în 1983 și nu au mai fost confirmate de alte studii.

Tabel 13.9 Rezistența plasmidică la metale grele

Metal	Bacteria care posedă plasmide
Derivați minerali de mercur	*S. aureus, E. coli, Salmonella, K. pneumoniae, Serratia spp. Proteus spp., P. aeruginosa*
Derivați organici de mercur	*S. aureus, E. coli, K. pneumoniae, Serratia spp., P. aeruginosa*
Argint	*E. coli, Salmonella spp.*
Arsenic, Antimoniu	*S. aureus, E. coli*
Cadmium	*S. aureus, Alcaligenes entrophus*
Cobalt	*E. coli*
Cupru	*E. coli*
Nichel	*E. coli*
Plumb	*S. aureus*
Zinc	*S. aureus*

Rezistența bacteriană plasmidică la alte antiseptice și dezinfectante

Rezistența la compușii fenolici este rară; a fost pusă în evidență pentru hexaclorfen și este asociată cu rezistența la antibiotice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezistența la formol a fost descrisă inițial la *Serratia marcenscens* și apoi la alte enterobacterii.

Tulpinile rezistente au CMI > 4 – 6 ori decât cel necesar pentru inhibarea tulpinilor sensibile.

Consecințele epidemiologice ale rezistentei la antiseptice și dezinfectante sunt evidente. Oricare ar fi mecanismul de rezistență, bacteriile rezistente sunt selectate prin utilizarea acestor produși în concentrații mai mici decât cele active. Pentru a evita acest aspect trebuie să se țină seama de două elemente: 1. nivelul de sensibilitate al bacteriei; 2. condițiile de utilizare a produsului.

Primul aspect implică cunoașterea activității bactericide in vitro a fiecărui produs asupra principalelor grupe de bacterii şu anume determinarea concentrației bactericide limitate, active asupra bacteriilor mai puțin sensibile. Concentrația de utilizare trebuie să fie net superioară acesteia.

Condițiile de utilizare a produsului impun confruntarea acestuia cu diversele condiții care pot diminua activitatea sa: factori fizico-chimici, starea fiziologică a bacteriei, configurația populațiilor bacteriene, mai ales când sunt organizate în biofilme.

Riscul selectării de bacterii rezistente este și mai important în cazul bacteriilor multirezistente la antibiotice, datorită plasmidelor antotransferabile, care posedă și gene de rezistență la antiseptice și dezinfectante.

Bibliografie

AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th ed, part 4: Disinfectants. Washington. Association of Official Analytical Chemists, 1984.

Bean HS. *Types and characteristics of disinfectants.* J Appl Bacteriol, 30: 6-16, 1967.

Block SS. (ed). *Disinfection, Sterilisation and Preservation*, 4th edn. Philadelphia. Lea and Febiger, 1991.

Russell AD. *Bacterial spores and chemical sporicidal agents.* Clin Microbiol Rev, 3: 99-119, 1990.

Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA (ed). *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, Decand edn. Oxford: Blackwell Science, 1992.

Smith DH. *R-factors mediate resistance to mercury, nikel and cobalt.* Science, 156, 1114-1115, 1967.

Sykes G. *The sporicidal properties of chemical disinfectants.* J Appl Bacteriol, 33: 147-156, 1970.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14

Determinarea activităţii in vitro a antisepticelor şi dezinfectantelor

Studiile realizate in vitro urmăresc evaluarea activităţii antimicrobiene a dezinfectantelor şi antisepticelor, stabilirea modului de acţiune, definirea spectrului de acţiune, determinarea influenţei parametrilor fizico-chimici (temperatură, pH, ioni) şi chimici (proteine, detergenţi) asupra acţiunii acestora.

Metode de studiu a activităţii in vitro a antisepticelor şi dezinfectantelor asupra bacteriilor şi ciupercilor

Activitatea antibacteriană

După *modul de acţiune* se disting:

- efectul letal (efect bactericid, fungicid, sporicid, eventual virulicid), ireversibil;
- efectul de inhibare a creşterii (bacteriotatic, fungistatic sau de inhibare a multiplicării virale), temporar şi deci reversibil.

Spectrul de acţiune larg: un antiseptic sau dezinfectant trebuie să acţioneze asupra speciilor Gram-pozitive, Gram-negative, fără a exclude *Nocardia, Corynebacterium, Mycobacterium* la care pătrunderea produsului depinde de structura peretelui celular.

Evaluarea activităţii unui produs decurge din extrapolarea la populaţiile microbiene a rezultatelor obţinute cu tulpini reprezentative pentru ansamblul microorganismelor şi nu cu tulpini cunoscute pentru rezistenţa la diferite concentraţii a agenţilor antimicrobieni.

Activitatea biocidelor (antiseptice, dezinfectante şi agenţi de preservare)asupra microorganismelor, depinde de:

- condiţiile fizice din mediu;
- natura, structura, compoziţia şi starea microorganismului;
- abilitatea microorganismului de a degrada sau transforma aceşti compuşi în forme inactive.

Se au în vedere trei aspecte principale privind factorii care influenţează activitatea: pre-tratament, în cursul tratamentului şi după tratament.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Condiţiile pre-tratament

Mediul de cultură influenţează prin compoziţie sensibilitatea faţă de agenţii antimicrobieni. Bacteriile Gram-pozitive "îngrăşate" se obţin în medii cu glicerol; alterarea lipidelor din peretele celular afectează sensibilitatea celulei mai ales faţă de fenoli. *Escherichia coli* cultivată pe mediu care conţine *L-alanină*, prezintă modificări care-i măresc permeabilitatea, deci sensibilitatea la biocide.

Factorii din cursul tratamentului

Concentraţia. Studiile de cinetică au urmărit efectul concentraţiei letale, utilizând simbolul η (coeficientul de diluţie, exponentul concentraţiei) care reprezintă o măsură a efectului modificării concentraţiei (sau diluţiei) asupra ratei morţii celulelor. Pentru a determina η este necesar să se măsoare timpul necesar pentru a produce acelaşi grad de omorâre a bacteriilor la două concentraţii diferite ale agentului antimicrobian.

Astfel, dacă C_1 şi C_2 sunt două concentraţii iar t_1 şi t_2 sunt timpii necesari pentru a reduce populaţia bacteriană în acelaşi grad, rezultă că:

$$C_1^{\eta} t_1 = C_2^{\eta} t_2 \qquad \text{sau}$$

$$\eta = (\log t_2 - \log t_1) / (\log C_1 - \log C_2)$$

Reducerea concentraţiei substanţei (valori mari ale η) presupune creşterea timpului necesar pentru a obţine grade de omorâre comparabile (Tabel 14.1).

Tabelul 1. Coeficienţii de diluţie (η) pentru diferiţi agenţi antimicrobieni

Substanţa	Valori η	Creşterea factorului timp când concentraţia se reduce la:	
		1/2	1/3
Fenoli	6	2^6 (64x)	3^6 (729x)
Alcool	10	2^{10} (1024x)	3^{10} (59 000x)
Parabene	2,5	$2^{2,5}$ (5,7x)	$3^{2,5}$ (15,6x)
Clorhexidina	2	4x	8x
Compuşi de mercur	1	2x	3x
Compuşi de amoniu quaternar	1	2x	3x
Formaldehida	1	2x	3x

BUAV IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cunoaşterea efectului concentraţiei asupra activităţii antimicrobiene este esenţială pentru:

- evaluarea activităţii biocide;
- testele de sterilitate în cazul produselor farmaceutice şi medicale;
- aprecierea adecvată a nivelului de preservare în produsele farmaceutice;
- a decide dacă instrucţiunile privind diluţiile sunt aplicabile în practică.

Temperatura

În mod obişnuit, activitatea creşte cu temperatura. Coeficientul de temperatură Q_{10} se referă la modificările ce au loc în activitate pentru fiecare creştere a temperaturii cu 10^0 C. Acest coeficient este mic pentru formol, mediu pentru derivaţi fenolici şi ridicat pentru alcoolii alifatici.

Coeficientul de temperatură, pentru acelaşi produs variază în funcţie de microorgansim.

Prezenţa materiilor organice

După natura agentului antimicrobian, materiile organice (ser, sânge, puroi, pământ, resturi alimentare, reziduuri uscate de lapte, materii fecale) interferă cu activitatea antimicrobiană, fie prin adevărate "reacţii" chimice (oxidare sau reducere) între biocid şi materia organică, care consumă produsul activ, fie prin fenomene de absorbţie de suprafaţă care reduc disponibilitatea de atac asupra microorganismelor.

Materiile organice reduc efectul hipocloriţilor asupra bacteriilor (inclusiv mycobacterii şi spori), virusurilor şi fungilor; de asemenea, prezenţa acestora diminuează şi activitatea fenolilor.

Dezinfectantele utilizate în industria farmeceutică, a cosmeticelor, alimentară manifestă o reducere a activităţii în prezenţa pulberilor organice.

Plecând de la aceste constatări, în mediile de testare s-au introdus iniţial sânge, ser sau lapte, apoi pentru o mai bună standardizare a condiţiilor experimentale – extract de levuri sau albumină bovină.

PH – ul

Influenţa pH-ului este considerabilă deoarece:

- modifică sarcinile electrice de la suprafaţa celulei. La un pH ridicat, numărul grupărilor încărcate negativ de la suprafaţa celulei creşte şi are ca rezultat creşterea gradului de legare pentru moleculele încărcate pozitiv.
- modifică structura moleculei. În general anvelopa celulară este străbătută de formele neionizate, dar ionizarea poate favoriza pasajul moleculelor care posedă două situsuri

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ionizabile. Glutaraldehida este mai stabilă la pH acid dar activitatea creşte la pH alcalin şi interacţiunea cu grupările amino are loc la pH de peste 7.

Ionii bivalenţi (Ca^{++}, Mg^{++}), asociaţi cu duritatea apei, intervin în activitatea antisepticelor şi dezinfectantelor prin formarea de complexe insolubile sau inactive cu agenţii chelatori, dar şi prin asocierea cu structurile bistratificate fosfolipidice care formează membranele (membrana citoplasmatică şi la bacteriile Gram-negative, membrana externă), asociere care limitează pasajul trans-membranar.

Astfel, se explică asocierea unor agenţi, cum ar fi EDTA (etilendiaminatetraacetic acid)la antiseptice şi dezinfectante, pentru a reduce interferenţa apei dure asupra activităţii bactericide, mai ales în cazul bacteriilor Gram-negative.

Aditivi şi excipienţi

Diversele macromolecule şi mai ales polimerii (polietilenglicolii) au capacitatea de a reduce activitatea agenţilor antimicrobieni. Aceşti aditivi permit reducerea fluidităţii compusului şi obţinerea unei vâscozităţi adecvate pentru utilizare.

În preparatele spumante sunt incluşi diferiţi agenţi tensioactivi, dintre care unii (mai ales cei anionici şi cationici) au proprietăţii antibacteriene proprii. Alţii în schimb sunt inhibitori ai activităţii antimicrobiene.

Săpunurile sunt utilizate ca agenţi de solubilizare atunci când trebuie preparate soluţii de fenol care au solubilitate scăzută în apă. În concentraţii mici, săpunurile modifică suprafaţa bacteriei prin creşterea permeabilităţii pentru fenol; în concentraţii mari au efect bactericid.

Substanţele preservante incluse în preparatele farmaceutice au activitate antimicrobiană şi sunt separate între faza apoasă şi uleioasă a preparatului; numeroase microorganisme cresc şi se multiplică în faza apoasă şi de aceea este necesară realizarea unor concentraţii adecvate de preservant în această fază.

Tipul de microorganism

Bacteriile Gram-pozitive, patogeni importanţi, sunt asociate cu degradarea produselor farmaceutice şi cosmetice. În general acestea sunt mai sensibile la biocide decât bacteriile Gram-negative, datorită compoziţiei peretelui celular, compus în mare parte din peptidoglican care formează o reţea săracă în lipide.

Cocii sunt omorâţi rapid de halogeni dar stafilococii sunt mai rezistenţi decât streptococii la alcooli şi oxid de etilen. Bacteriile Gram-pozitive sunt mai sensibile decât Gram-negativii la compuşii de amonium quaternar şi salicilanilide.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Puţine substanţe au efect sporicid: glutaraldehida, formaldehida, halogenii, oxidul de etilen. Fenolii, compuşii de amonium quaternar, compuşii de mercur, alcoolii, parabenele, au efect sporostatic.

Rezistenţa mycobacteriilor la numeroase dezinfectante este dată de compoziţia peretelui celular, care conţine caracteristic, lanţuri lungi de acizi micolici ce conferă proprietăţi hidrofobe. Sărurile de amonium quateranr sunt tuberculostatice; alcoolii, formaldehida, alcooluil iodat, oxidul de etilen au acţiune tuberculocidă. Glutaraldehida este considerată a fi un bun agent micobactericid.

Mucegaiurile şi ciupercile contaminează produsele famaceutice şi cosmetice; mulţi compuşi au acţiune atât antibacteriană cât şi antifungică: fenolii, compuşii de amonium quateranr, derivaţii organici de mercur, esterii acidului p-hidroxibenzoic, parabenele.

Majoritatea agenţilor cu acţiune bactericidă au şi acţiune virucidă. Virusurile fără anvelopă (ex. enterovirusurile) sunt mai puţin sensibile la numeroşi agenţi antimicrobieni. Dezinfectantele pe bază de clor sunt considerate ca fiind deosebit de eficiente asupra tuturor tipurilor de virusuri. Formaldehida, utilizată adesea în prepararea vaccinurilor virale, necesită un timp mai mare de acţiune pentru a avea efect virucid iar în stare de vapori, are putere mică de penetrare.

Oxidul de etillen, utilizat ca vapori şi lichid, are acţiune virucidă. Compuşii de mercur sunt inactivi asupra virusurilor. Virusul hepatitei B şi virusul imunofedicienţei umane (HIV) sunt rapid inactivate de glutaraldehidă şi compuşii pe bază de clor.

Prionii sunt rezistenţi la numeroase procese chimice de dezinfecţie şi de sterilizare fizică. Hidroxidul de sodiu este considerat a fi cel mai eficient decontaminant.

Biofilmele bacteriene. Interacţiunea bacteriilor cu suprafaţele este iniţial reversibilă, dar apoi ireversibilă. Adeziunea ireversibilă este iniţiată de bacterii care se fixează prin glicocalix (exopolisaharide). Bacteriile prin diviziune, rămân fixate în acest matrix şi formează un biofilm care colonizează suprafaţa. Bacteriile din biofilm sunt mult mai rezistente la agenţi antimicrobieni (ex. clor, clorhexidină, iod). Peroxidul de hidrogen este eficient în concentraţii mai mici decât cele necesare pentru dezinfecţia totală, asupra biofilmelor bacteriene.

Evaluarea activităţii antibacteriene şi antifungice a dezinfectantelor

Teste pentru determinarea activităţii antibacteriene a dezinfectantelor

Dezinfecţia este o eliminare selectivă a anumitor microorganisme în scopul prevenirii transmiterii lor, prin acţiunea asupra structurii sau activităţii lor metabolice.

Testele propuse pentru dezinfectante urmăresc să determine dacă microorganismele sunt

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cel mai utilizat test este recomandat de AOAC (1984) care este o adaptare a testului coeficientului fenolic. Suspensia standardizată a microorganismului test *Trichophyton mentagrophytes* este expusă acțiunii dezinfectantului şi după neutralizare sunt inoculate în bulion glucozat. Cea mai mare diluție care omoară microorganismele în 10 minute este considerată ca fiind diluția care poate dezinfecta rapid suprafețele neanimate contaminate cu fungi patogeni.

Bibliografie

Bean HS. *Types and caracteristics of dizinfectants*. J Applied Bacteriol, 30: 6-16, 1967.

Cremieux A. *Factors affecting the bactericidal action of disinfectants. Implication in the selection of resistant strains*. Drugs Exper Clin Res. 12: 899-903. 1986.

Cremieux A, Gaudin O. *Les methodes d'etude de l'activite in vitro des antiseptiques et desinfectants*. In: Antisepsie et desinfection, Ed. ESKA, 66-88, 1995.

Kelsey YC, Maurer IM. *An improved Kelsey-Sykes test for disinfectants*. Pharmaceutical J, 207: 528-530, 1974.

Official Methods of Analysis. *Phenol coefficient methods*. Ed Kenneth Helrich, published by the Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA, 133-146, 1990.

Russell AD. *Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents*. In: Principles and practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation. Eds: Russell AD, Hugo BW, Ayliffe GAJ. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 107-133, 1981.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15

Producerea şi controlul de calitate al produselor imunologice

Produsele imunologice se încadrează într-un grup de preparate farmaceutice care au origini diferite, dar toate se utilizează în scopul intensificării stării imune faţă de bolile infecţioase.

În prezent dispunem de trei categorii de produse imunologice: vaccinuri, imunoseruri şi imunoglobuline umane.

Vaccinurile sunt cele mai importante produse imunologice, care induc imunitate faţă de numeroase boli şi beneficiul adus oamenilor şi animalelor este comparabil cu cel al anestezicelor şi agenţilor antimicrobieni. Vaccinurile utilizate împotriva difteriei, tetanosului, tusei convulsive, poliomielitei, rujeolei au fost deosebit de eficiente în ţările în care acestea au fost incluse în programele de supraveghere a sănătăţii publice.

Programul de vaccinare coordonat de *Organizaţia Mondială a Sănătăţii* a dus la eradicarea variolei.

Imunoserurile care odinioară erau utilizate pe scară largă în profilaxia şi tratamentul multor infecţii, astăzi au întrebuinţare limitată; antitoxina tetanică este o excepţie deoarece este foarte eficientă în profilaxie. Imunoglobulinele umane sunt importante dar au utilizare restrânsă.

Acţiunea imunoserurilor şi imunoglobulinelor depinde de efectul protector al anticorpilor obţinuţi, în cazul imunoserurilor, de la animalele imunizate şi în cazul imunoglobulinelor, de la oameni care au fost imunizaţi sau care au avut un titru ridicat de anticorpi, ca urmare a unei infecţii anterioare. Acest tip de imunitate, numită imunitate pasivă se obţine imediat, dar este limitată în timp, pe durata cât nivelurile protective ale anticorpilor rămân în circulaţie.

Vaccinurile, imunoserurile şi imunoglobulinele au specificitate de acţiune: asigură imunitate numai pentru o singură infecţie. Specificitatea a stat la baza producerii de vaccinuri şi imunoseruri cu diverşi componenţi, cum ar fi vaccinul difteric/tetanos/pertussis, utilizat în prevenirea acestor boli infecţioase care afectează copiii.

Pe lângă aceste trei tipuri de produse imunologice, mai sunt încă două tipuri, a căror utilizare este de perspectivă: vaccinurile peptidice sintetice şi anticorpii monoclonali; aceşti compuşi, care reprezintă teme de cercetare, nu sunt încă utilizaţi în profilaxie sau terapie.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vaccinurile sunt utilizate pentru prevenirea bolilor infecţioase, deşi sunt obţinute prin diferite metode din microorganisme patogene. Inoculate în organismul uman sau animal, stimulează sistemul imun care sintetizează anticorpi cu rol în distrugerea microorganismelor infectante sau în neutralizarea toxinelor bacteriene.

Tehnologia de obţinere a vaccinurilor are la bază procedee prin care se obţin, din agentul patogen, componente sau produse, imunogene, care şi-au pierdut proprietăţile patogene dar îşi menţin proprietatea de a induce răspunsul protector după administrare.

Vaccinurile utilizate în prezent în programele de vaccinare sunt acceptate sub cinci forme:

Vaccinurile vii, preparate din bacterii vii sau virusuri care, administrate pe căi adecvate, produc simptome sau majoritatea simptomelor bolii infecţioase.

În cursul acestei infecţii constituenţii microbieni din vaccin produc un răspuns imun care asigură protecţia faţă de infecţia gravă, naturală.

Primul vaccin viu, vaccinul variolei a fost introdus în 1796 de Edward Jenner care a constatat că un atac uşor, în condiţii cunoscute, cu virusul variolei bovine, protejează lăptăresele de variolă în cursul epidemiilor cauzate de acestă boală. El utilizează fluidul (limfa) luat din pustulele de pe mâinile lăptăreselor, cauzate de virusul variolei bovine pentru inocularea unui viţel. După un timp inoculează viţelul cu lichidul obţinut dintr-o infecţie cu virusul variolei şi constată că nu se întâmplă nimic. Viţelul protejat în acest mod de infecţia cu virusul variolei bovine, rămâne sănătos.

Utilizarea de către Jenner a agentului cauzal al infecţiei pentru obţinerea protecţiei s-a făcut în paralel cu utilizarea bacilului Calmette – Guerin (BCG), o tulpină de bacil al tuberculozei bovine, pentru a obţine o protecţie în infecţiile cauzate de tulpini umane. În acest caz, patogenitatea agentului infecţios a fost diminuată prin subcultivări repetate, în laborator, pe medii artificiale. Vaccinurile vii, cum ar fi vaccinul variolei şi vaccinul BCG sunt asociate cu fenomenul de protecţie – încrucişată şi sunt o excepţie deoarece majoritatea vaccinurilor sunt obţinute pornind de la agentul cauzal al bolii împotriva căreia se urmăreşte obţinerea protecţiei. Astfel, poliovirusurile din infecţiile umane sunt cultivate în laborator prin metode care fac posibilă selecţia virusurilor infecţioase dar nepirogene, utilizate pentru polivaccinuri orale. Procedee asemănătoare se utilizează şi pentru obţinerea de virusuri care sunt utilizate curent pentru vaccinurile vii ale pojarului, oreionului, rubeolei şi febrei galbene.

Microorganismele care au capacităţi limitate de a produce boala infecţioasă sunt utilizate ca vaccinuri vii, cu virulenţa atenuată şi sunt frecvent utilizate pentru obţinerea vaccinurilor.

Microorganismele din vaccinurile vii se multiplică logaritmic în gazdă, până la apariţia răspunsului imun urmărit. La persoanele care răspund, vaccinurile vii atenuante (rujeola, rubeola, oreionul) par a oferi protecţie pentru toată viaţa, deşi se ştie că la unii indivizi imunitatea scade şi necesită sprijin ulterior pentru protecţia pe termen lung.

Vaccinurile omorâte sunt suspensii de bacterii sau virusuri care au fost omorâte prin căldură sau cu dezinfectante (fenol, formaldehidă).

Deoarece bacteriile omorâte nu se multiplică şi nu produc boala este necesar ca în fiecare doză de vaccin omorât să existe un număr suficient de microbi care să stimuleze, prin vaccinare, sistemul imun. Vaccinurile omorâte trebuie să fie relativ concentrate şi atunci este necesar să se împartă cantitatea totală de vaccin, care este necesară pentru inducerea protecţiei, în două sau trei doze, administrate la intervale de câteva zile sau săptămâni. Acest mod de administrare are avantajul de a amplifica răspunsul secundar când vaccinul este administrat unei persoane al cărei sistem imunitar a fost sensibilizat cu o doză anterioară din acelaşi vaccin. Cele mai cunoscute vaccinuri omorâte sunt vaccinurile tusei convulsive (pertussis), holerei, febrei tifoide, rabiei, polivaccinul tip Salk.

Vaccinurile toxoide sunt obţinute din toxinele bacteriene. Toxina este separată de celula bacteriană şi tratată prin metode care elimină toxicitatea fără a anula şi imunogenitatea. În acest scop se utilizează formalina (aproximativ 38% formaldehidă gazoasă în apă). Vaccinurile toxoide sunt foarte eficiente în profilaxia unor infecţii (difteria, tetanosul), date de bacterii care produc toxine cu acţiune nocivă fiziologică şi biochimică.

Vaccinuri care conţin componenţi celulari bacterieni

Vaccinurile mai noi conţin componente ale celulei bacteriene şi au avantajul că determină răspunsul imun numai în prezenţa uneia sau a câtorva componente bacteriene. Răspunsul imun este mai specific şi mai eficient, cantitatea de material din vaccin este mai redusă şi posibilitatea reacţiilor adverse este diminuată. Dintre vaccinurile de acest tip, vaccinul tusei convulsive (pertussis) poate fi preparat dintr-un singur component celular sau din mai multe componente bacteriene. Alte vaccinuri, bazate pe unul sau mai mulţi componenţi ai capsulei polizaharidice sunt: vaccinul tip B *Haemophilus influenzae*, vaccinul tip A şi C *Neisseria meningitidis*, vaccinul polizaharidic pneumococal 23 – valent, vaccinul tifoid acelular.

Vaccinuri cu subunităţi virale. Un număr de trei vaccinuri cu subunităţi virale sunt disponibile: două vaccinuri gripale şi vaccinul hepatitei B.

Vaccinurile gripale sunt preparate prin tratarea particulelor gripale din oul embrionat de găină, infectat cu acest virus, cu un agent activ de suprafaţă. Particulele virale sunt distruse cu eliberarea a două subunităţi virale: hemaglutinina şi neuraminidaza, care sunt prezente în vaccin. Vaccinul hepatitei B este preparat din antigenul B de suprafaţă (HBsAg), obţinut din sângele pacienţilor cu hepatită B. Această sursă de antigen este limitată şi a fost înlocuită cu celule de drojdii care, prin inginerie genetică, exprimă gena HBsAg pe parcursul fermentaţiei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Producerea vaccinurilor

Vaccinurile se administrează oamenilor sănătoşi pentru prevenirea bolii şi prin urmare trebuie să fie eficiente şi lipsite de potenţial nociv, aspecte de care este răspunzător producătorul. Rareori s-au înregistrat eşecuri fie în producerea în bune condiţii, fie în asigurarea calităţii. De exemplu, utilizarea vaccinului Polio Salk incomplet omorât, a afectat în 1955 aproape 200 persoane care au primit vaccinul şi contacţii acestora. Producţia inconstantă şi necontrolată de vaccinuri în ţările în curs de dezvoltare a dus uneori la comercializarea de produşi ineficienţi care nu au asigurat imunitatea protectoare urmărită.

Sistemul de obţinere a tulpinilor microbiene

Izolarea microorganismului adecvat este primul pas în producerea vaccinurilor microbiene. Aceste izolate provin din infecţii umane şi în acest caz obţinerea tulpinilor pentru producerea de vaccinuri este simplă. Uneori este însă necesară manipularea şi selectarea în laborator a tulpinilor necesare.

Vaccinurile vii sunt selectate sau modificate genetic pentru a deveni lipsite de virulenţă sau cu virulenţă foarte atenuată, fără a-şi pierde imunogenitatea. Aceşti antigeni trebuie să determine o boală subclinică, care mimează infecţia naturală fără manifestări clinice.

Tulpina este cultivată sub formă de cultură pură şi o cantitate din cultură este repartizată în flacoane păstrate la -70^0 C sau liofilizate: acesta reprezintă lotul de însămânţare. Din acest lot, unul sau mai multe flacoane sunt utilizate ca inocul pentru obţinerea unui număr limitat de flacoane de vaccin, care mai întâi sunt examinate amănunţit în laborator şi apoi dacă sunt corespunzătoare sunt testate clinic pentru verificarea eficientei şi a siguranţei în administrare.

Dacă rezultatele clinice sunt satisfăcătoare, lotul de însămânţare este validat şi utilizat pentru producţia de vaccin.

Obţinerea bacteriilor şi a componentelor bacteriene

Bacteriile şi componenţii bacterieni necesari producţiei de vaccinuri bacteriene sunt obţinuţi uşor în laborator pe medii de cultură şi prin metode de fermentaţie bine puse la punct.

La sfârşitul procesului se urmăreşte obţinerea unor componente purificate şi concentrate, care pot fi păstrate timp îndelungat sau transformate în produse comerciale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fermentația

Producerea vaccinului bacterian începe cu pasajul conținutului flacoanelor liofilizate sau congelate pe medii de laborator (1–2 pasaje). După multiplicarea corespunzătoare, sunt inoculate în fermentatoare cu mediu de producție, omogenizat continuu. pH-ul mediului și potențialului de oxido-reducere a mediului sunt urmărite și ajustate în perioada de creștere astfel încât să se obțină o masă bacteriană mare.

Pentru bacteriile cu creștere rapidă, producția maximă se obține după aproximativ o zi, dar în cazul bacteriilor cu creștere lentă, masa bacteriană maximă nu se realizează mai devreme de două săptămâni. La sfârșitul perioadei de creștere, conținutul fermentatorului este supus imediat următoarei etape de producere a vaccinului.

Procesele la care este supusă producția bacteriană

Producția bacteriană este un amestec complex de celule bacteriene, produși metabolici și mediu epuizat.

În cazul vaccinurilor atenuate, bacteria trebuie separată și resuspendată într-un lichid adecvat care să permită liofilizarea. Biomasa microorganismelor patogene este periculoasă și trebuie manevrată cu atenție de-a lungul celorlalte etape ale producției.

1. *Omorârea bacteriilor vii din cultură* se face prin căldură sau cu dezinfectante. Pentru *Bordetella pertussis* utilizată în scopul obținerii vaccinurilor tusei convulsive se utilizează căldura sau formalina, iar fenolul, pentru *Vibrio chlorae* (din care se obține vaccinul holeric) *și Salmonella typhi* (pentru vaccinul tifoid).

2. *Separarea celulelor bacteriene de mediul de cultură* se face prin centrifugare; o altă metodă este precipitarea celulelor prin micșorarea pH-ului.

În cazul vaccinurilor preparate din celule, lichidul este îndepărtat iar celulele resuspendate într-o soluție salină; dacă vaccinul este obținut din constituenți prezenți în lichid, sunt îndepărtate celulele.

3. *Fracționarea* constă în extragerea și obținerea în formă purificată a componentelor bacteriene prezente în celulă sau mediul de cultură.

Antigenele polizaharidice sunt separate din celulele de *Neisseria meningitidis* prin tratare cu *hexadeciltrimetilamonium bromid* și cele din *Streptococcus pneumoniae* cu etanol. Puritatea materialului extras trebuie verificată prin resolubilizare într-un solvent adecvat și precipitare. După purificare, componentul poate fi uscat, sub formă de pulbere, păstrat astfel mult timp și dacă este necesar încorporat în cantitate exactă într-un vaccin.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. *Detoxifierea* este procesul prin care toxinele sunt transformate în toxoide inofensive. Pentru detoxifierea toxinelor produse de *Corynebacterium diphteriae* şi *Clostridium tetani* se utilizează formalina. Detoxifierea poate fi efectuată fie în fermentator fie după ce toxina purificată a fost obţinută prin fracţionare.

5. *Adsorbţia componentelor vaccinului* se face pe un adjuvant mineral sau Carrier (purtător), cum ar fi hidroxidul de aluminiu (utilizat frecvent), fosfatul de aluminiu şi fosfatul de calciu, care au ca efect creşterea imunogenicităţii şi diminuarea toxicităţii locale sau sistemice a vaccinului.

Vaccinurile tetanosului, difteriei, difterie-tetanos, difterie-tetanos-pertussis sunt preparate ca vaccinuri adsorbite.

6. *Conjugarea* constă în asocierea componentelor vaccinului care induce doar un răspuns imun slab cu cele ale unui vaccin care induce un răspuns imun bun. Prin conjugarea toxoidelor difterice şi tetanice cu polizaharidul obţinut din *Haemophilus influenzae* şi cu proteina din membrana externă de la *Neisseria meningitidis* se obţine amplificarea imunogenicităţii pentru copii, a polizaharidului *H. influenzae Tip b.*

Producerea virusurilor şi a componentelor virale pentru vaccinurile virale

Primele vaccinuri au fost obţinute pe animale: vaccinul variolei, din tegumentul vacilor şi oilor; vaccinul rabiei din măduva spinării la iepuri sau din creierul şoarecilor. Aceste metode nu mai sunt utilizate, astăzi singura gazdă utilizată fiind oul de găină embrionat. Majoritatea virusurilor necesare producerii de vaccinuri sunt obţinute pe culturi de celule.

Pentru obţinerea vaccinurilor gripale şi ale febrei galbene, virusurile sunt cultivate pe ou de găină embrionat; virusul gripal se acumulează în cantitate mare în lichidul alantoidian iar virusul febrei galbene se dezvoltă în sistemul nervos al embrionului.

Procedee de obţinere a virusurilor

Virusul gripal se obţine prin centrifugarea lichidului alantoidian. Concentratul obţinut este tratat cu diverşi agenţi care descompun virusul în componentele sale; vaccinul este preparat din particule ale virusului sau antigene de suprafaţă.

Virusul febrei galbene se obţine prin omogenizarea în apă a embrionului până se obţine o pastă care conţine virusul. Prin centrifugare resturile embrionare se depun iar virusul este prezent în supernatant.

BCUAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din culturile de celule se obțin fluide infectate, care conțin puține resturi celulare și prin filtrare se obțin suspensii limpezi. Majoritatea vaccinurilor virale obținute din culturi de celule, conțin virusuri vii atenuate și etapa de inactivare este exclusă din procesul de preparare. Sunt totuși două excepții: vaccinul cu virus inactivat al poliomielitei, inactivat cu formalină diluată sau beta – propiolactonă și vaccinul rabiei inactivat cu beta-propiolactonă. Prepararea acestor vaccinuri inactivate necesită faza de concentrare, cu adsorbția și diluarea virusului în cazul vaccinului poliomielitei și ultrafiltrarea în cazul vaccinului rabiei.

Materialul astfel obținut este păstrat până la obținerea vaccinului în forma finală, la temperatura de -70^0 C.

Amestecul

Diferite componente ale vaccinului sunt amestecate într-un recipient mare cu agitator și deschideri pentru adaosul componenților și evacuarea omogenatului final. Pentru amestecul de vaccinuri bacteriene, componenții activi sunt diluați direct în vas; lichidul de diluare conține în mod obișnuit un agent de prezervare cum ar fi tiomersalul.

Produsul final care conține un singur component bacterian se obține prin adăugarea suspensiei bacteriene în cantitatea necesară, pentru a obține concentrația finală corespunzătoare.

Vaccinurile combinate se obțin prin adăugarea fiecărui component în ordinea impusă de procesul tehnologic. Amestecul final se divizează în volume mici, ușor de manipulat.

Umplerea și uscarea

Produsul final este distribuit în flacoane, într-o singură doză sau mai multe doze. Vaccinurile care sunt repartizate sub formă lichidă sunt închise iar vaccinurile sub formă de preparat uscat sunt liofilizate înainte de închidere.

În Tabelul 15.1 sunt prezentate vaccinuri bacteriene, care conțin un singur component, materialul de bază din care se obțin, procedeele de obținere și testele pentru verificarea eficienței și siguranței în administrare.

Vaccinurile multicomponente care se obțin prin amestecarea a două sau mai multe componente, necesită verificarea fiecărui component sub aspectul eficienței și siguranței în administrare.

Vaccinurile virale monocomponente sunt prezentate în Tabelul 15.2. Doar un singur vaccin combinat este utilizat: vaccinul rujeolă, oreion, rubeolă (ROR).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 15.1 Vaccinuri bacteriene utilizate pentru prevenirea infecţiilor la om.

Vaccin	Sursa	Procedeul de obţinere	Dozarea activităţii	Teste de protecţie
Antrax[x]	Mediu cu cultura de *B. anthracis*	1. Separarea antigenului din mediu 2. Adsorbţie	3+3 dozări cantitative pe cobai inoculaţi cu *B. anthracis*	Exclusă prezenţa de *B. anthracis* viu şi a toxinei antraxului
BCG[x]	Cultura de celule ale BCG vii în mediu lichid sau pe mediu solid	1. Bacteria separată prin centrifugare din mediu 2. Resuspendarea într-un mediu stabilizator 3. Congelare-uscare	Numărarea celulelor viabile, inducerea sensibilităţii la tuberculină la cobai	Exclusă prezenţa mycobacteriilor virulente; absenţa reacţiei dermice excesive
Difteric (adsorbit)[x]	Cultura de *C. diphteriae* în mediu lichid	1. Separarea şi concentrarea toxinei 2. Conversia toxinei în toxoid 3. Adsorbţia toxoidului pe adjuvant	3+3 dozări cantitative pe cobai prin inoculare intradermică	
Haemophylus influenzae tip B[x]	Cultura de *H. influenzae* tip B	1. Separarea polizaharidului capsular 2. Conjugare cu o proteină	Evaluarea conţinutului în polizaharid capsular	
Neisseria meningitidis tip A şi C[+]	Cultura de *N. meningitidis* serotipurile A şi C	1. Precipitare cu hexadeciltrimetilamonium bromid 2. Solubilizare şi purificare 3. Amestec	Evaluarea conţinutului în polizaharid capsular	

Tabelul 1 - continuare

Polizaharidul pneumococic[+]	Cultura a 23 tipuri de *S. pneumoniae*	1. Precipitarea polizaharidelor cu etanol 2.Amestecarea în vaccinul polivalent	Evaluarea fizico – chimică a polizaharidelor	
Tetanic (adsorbit)[x]	Cultura de *Clostridium tetani* în mediu lichid	1. Conversia toxinei în toxoid 2.Separarea şi purificarea toxoidului 3. Adsorbţia pe adjuvant	3+3 dozări pe şoarece prin inoculare cu toxină tetanică	Inocularea cobailor pentru a exclude prezenţa toxinei netoxoide

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 15.1 - Continuare

Celular tifoidic^{+}	Cultura de *Salmonella typhi* pe mediu lichid	1. Omorârea prin căldură sau fenol 2. Separarea şi resus - pendarea bacteriei în ser fiziologic	Inducerea anticorpilor la iepure	Exclusă prezenţa formelor viabile de *S. typhi*
Antigen V_1 capsular polizaharidic tifoidic^{+}	Cultura de *S. typhi* pe mediu lichid	1.Extracţia antigenului capsular	Evaluarea antigenului capsular	
Vaccinul viu tifoidic^{+}	Cultura de *S. typhi* tulpina Ty 21A	1. Încapsulare	Evaluarea antigenului capsular	
Celular al tusei convulsive (Pertussis)^{x}	Cultura de *Bor - detella pertussis* pe mediu lichid sau solid	1. Recoltare 2. Omorârea cu forma - lină 3. Resuspendare	3+3 dozări cantitative pe şoarece prin inocula- re intracerebrală cu suspensie viabilă de *B. pertussis*	Evaluarea bacteriei până la concentraţia de $20x10^9$ per doză umană. Testul creşterii în greutate a şorecilor pentru a exclude toxicitatea excesivă
Tusea convulsivă (Pertussis) (celular)$^{+}$	Cultura de *Bor – detella pertussis*	1. Recoltarea 2. Extracţia şi amestecul componentelor celulare	Ca şi pentru vaccinul celular	Testul creşterii în greutate a şorecilor pentru a exclude toxicitatea excesivă

^{x} – vaccinuri utilizate în programele de imunizare convenţională;

$^{+}$ - vaccinuri utilizate pentru protecţia suplimentară , în anumite circumstanţe.

Se mai utilizează polio vaccinul inactivat (Salk) şi polio vaccinul viu (Sabin) (oral) care sunt vaccinuri combinate, obţinute din amestecul a trei serotipuri de poliovirus.

Vaccinurile gripale combinate conţin componente a trei tulpini de virus, frecvent două tulpini de virus gripal A şi o tulpină de virus gripal B. Virusul gripal, caracterizat biologic prin variaţia antigenică, formează periodic o nouă versiune antigenică, cauzând pandemii pentru care un nou vaccin trebuie inventat, produs şi distribuit rapid.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 15.2 Vaccinuri virale utilizate pentru prevenirea bolilor infecţioase la om.

Vaccin	Sursa	Procedeul de obţinere	Dozarea activităţii	Teste de protecţie
Hepatita A^{+}	Celule diploide umane infectate cu virusul hepatitei A	1. Separarea virusului din celule 2. Inactivarea cu HCHO 3. Adsorbţia pe gel de $Al(OH)_3$	Dozarea conţinutului de antigen prin ELISA	Inocularea culturilor de celule pentru a exclude prezenţa virusului viu
Hepatita B^{+}	Celule de drojdii modificate genetic pentru a exprima antigenul de suprafaţă	1. Separarea HBsAg din celulele de drojdii 2. Adsorbţia pe gel de $Al(OH)_3$	Dozarea imunogenicităţii sau dozarea HBsAg prin ELISA	Testul pentru verificarea prezenţei ADN din celula drojdiei
Gripal (influenza)$^{+}$	Lichidul alantoidian din oul de găină embrionat infectat cu virusurile gripale A şi B	1. Recoltarea virusului 2.Distrugerea cu un agent activ de suprafaţă 3. Amestecul componentelor diferitelor serotipuri	Dozarea hemaglutininei prin imunodifuzie	Inocularea oului embrionat de găină pentru a exclude prezenţa virusului viu
Gripal (antigen de suprafaţă)$^{+}$	Lichidul alantoidian din oul de găină embrionat infectat cu virusurile A şi B	1. Inactivarea şi dezintegrarea 2. Separarea hemaglutininei şi neuraminidazei 3.Amestecul hemaglutininelor şi neuraminidazei din diferite serotipuri	Dozarea hemaglutininei prin imunodifuzie	Inocularea oului embrionat de găină pentru a exclude prezenţa virusului viu
Rujeola^{x}	Cultura de celule de embrion de găină infectată cu virusul rujeolei	1. Clarificarea 2. Congelare - uscare	Titrarea infectivităţii în culturi de celule	Teste de excludere a prezenţei virusurilor străine
Oreion^{x}	Cultura de celule de embrion de găină infectată cu virusul oreionului	1. Clarificarea 2. Congelare - uscare	Titrarea infectivităţii în culturi de celule	Teste de excludere a prezenţei virusurilor străine
Poliomielita (inactivat)$^{+}$ (tipul Salk)	Culturi de celule diploide umane infectate cu fiecare din cele trei serotipuri ale poliovirusului	1. Clarificarea 2.Inactivarea cu formalină 3.Concentrarea 4.Amestecarea virusurilor din fiecare serotip	Inducerea de anticorpi antipoliovirus la pui sau cobai	Inocularea culturilor de celule şi a măduvei spinării la maimuţă pentru a exclude virusul viu
Poliomielita (viu sau oral)^{x} (tipul Sabin)	Culturi de celule infectate cu poliovirus atenuat din cele trei serotipuri	1. Clarificare 2.Amestecul celor trei serotipuri de virus în mediu de stabilizare	Titrarea infectivităţii fiecărui serotip	Testul pentru verificarea prin inoculare în măduva spinării la maimuţă şi compararea leziunilor cu cele produse de vaccinul de referinţă
Rabia^{+}	Celule diploide umane infectate cu virusul rabiei	1. Clarificarea 2. Inactivarea cu beta-propiolactona	3+3 dozări pe şoarece	Inocularea culturilor de celule pentru a exclude prezenţa virusului viu

Tabel 15.2 - Continuare

Rubeola[x] (pojarul german)	Culturi de celule diploide umane infectate cu virusul atenuat al rubeolei	1. Clarificarea 2. Amestecarea cu stabilizator 3. Congelare-uscare	Titrarea infectivității pe culturi de celule	Teste pentru excluderea prezenței virusurilor străine
Varicella[+]	Culturi de celule diploide umane infectate cu virusul atenuat al varicellei	1. Clarificarea 2. Congelare-uscare	Titrarea infectivității pe culturi de celule	Inocularea culturilor de celule pentru a exclude prezența virusurilor străine
Febra galbenă[+]	Omogenat apos din embrionul de pui infectat cu virusul atenuat al febrei galbene	1.Centrifugare pentru îndepărtarea resturilor celulare 2.Congelare-uscare	Titrarea infectivității pe culturi de celule în placă	Teste pentru excluderea prezenței virusurilor străine

[x] – vaccinuri utilizate în programele convenționale de imunizare;

[+] - vaccinuri utilizate pentru asigurarea unei protecții suplimentare în anumite circumstanțe.

Controlul de calitate

Pentru a verifica şi siguranța în administrare, fiecare serie de producție a fiecărui produs este supusă controlului de calitate care se face în trei etape: a). controlul în timpul procesului de obținere; b). controlul produsului final: c). asigurarea ca fiecare materie primă, produs intermediar, produs final şi etapele procesului sunt adecvate.

Rezultatele testelor controlului de calitate sunt precizate detaliat, astfel că în țările în care producerea vaccinurilor este reglementată prin lege, acestea sunt controlate de autorități care hotărăsc dacă o serie dintr-un produs poate fi comercializată sau retrasă.

a). *Controlul în timpul procesului de obținere a vacinurilor* se efectuează asupra materiilor prime şi a produselor intermediare. În procesul de producție se fac numeroase teste, recomandate de normativele naționale, mai ales teste de sterilitate care să ofere garanția că etapele de obținere au decurs normal şi produsul final este corespunzător.

Controlul de calitate al vaccinurilor tetanic şi difteric necesită testarea prezenței toxinei libere, deoarece este posibil ca prin detoxifierea inadecvată cu formalină, în stadiul final produsul să posede o toxicitate necorespunzătoare. În acest stadiu, concentratele toxoide utilizate în prepararea vaccinurilor pot fi diluate, astfel că dacă volumul de vaccin inoculat animalelor test este limitat, testul este relativ insensibil.

Unele vaccinuri sunt mai puțin utilizate: vaccinul botulismului, vaccinul enteritelor necrotice, vaccinul *Pseudomonas aeruginosa* şi vaccinul tularemiei.

Vaccinurile virale, mai puțin utilizate sunt: vaccinul febrei hemoragice, vaccinul encefalitei japoneze B, vaccinul variolei, vaccinul encefalitei transmise de căpuşă, vaccinul encefalitei venezuelene.

BCU IASI CAROL I MEDICINA UNIVERSITY LIBRARY

În procesul de control totuşi se fac teste pe concentratul nediluat şi acesta creşte sensibilitatea metodei de peste 100 de ori.

Pentru prepararea vaccinului poliomielitei inactivat este importantă titrarea, înintea inactivării, a infectivității întregii cantități de poliovirus viu utilizat. Infectivitatea corespunzătoare a virusului din culturile de celule indică prezența unei cantități adecvate de virus în materialul inițial, această evaluare nemaifiind posibilă după o inactivare prin formolizare.

Altă măsură de control în procesul obținerii de vaccinuri virale constă în examinarea riguroasă a culturilor la țesuturi pentru a exclude contaminarea cu agenți infecțioşi. Culturile de celule de rinichi de maimuță sunt testate pentru a depista prezența herpes virusului B, virusului simian 40, a micoplasmelor şi a bacililor tuberculozei. Culturile de celule diploide umane şi liniile continue de celule sunt examinate microscopic (examenul cromosomilor) pentru a detecta eventualele modificări celulare care pot influența calitatea sau pot da efecte secundare nedorite.

b. Controlul produsului final.

Vaccinurile care conțin microorganisme omorâte sau produşii lor sunt testate, pentru verificarea eficienței, în cantități necesare asigurării protecției animalelor față de o anumită doză a agentului patogen sau a produşilor acestuia prin comparare cu vaccinul standard pentru a constata dacă asigură aceeaşi protecție.

Testul, conform recomandărilor date de British Pharmacopeia (1993) include 3 + 3 doze utilizate pentru testarea eficienței vaccinului tusei convulsive.

Câte trei serii logaritmice din dozele vaccinului de testat şi ale vaccinului standard sunt utilizate pentru inocularea unui număr de 16 şoareci. Doza medie este stabilită pe baza experiențelor anterioare, astfel încât să asigure efect protector pentru 50% din animalele incluse în test. După 14 zile şoarecii sunt infectați cu *Bordetella pertussis* şi după încă 14 zile sunt numărați supraviețuitorii din cele 6 grupuri de şoareci. Numărul supraviețuitorilor din fiecare grup este utilizat pentru calcularea activității vaccinului test raportată la activitatea vaccinului standard, prin metode statistice.

Activitatea vaccinului test se mai poate exprima şi în procente față de activitatea vaccinului standard (care se exprimă în unități internaționale, UI).

Un test similar este utilizat pentru verificarea activității vaccinului difteriei şi vaccinului tetanosului; în acest caz şoarecii sunt inoculați cu toxinele bacteriene corespunzătoare.

Vaccinurile care conțin microorganisme vii sunt testate pentru verificarea eficienței prin numărarea particulelor viabile. În cazul vaccinului BCG se fac diluții din vaccin şi sunt etalate, în volum fix, pe medii de cultură solide. După două săptămâni sunt numărate coloniile apărute şi se evaluează numărul de particule viabile din vaccinul nediluat. Eficiența vaccinurilor virale vii se

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

determină prin aceeaşi metodă cu excepţia că substratul de cultivare este reprezentat de celule vii. Diluţii din vaccin sunt inoculate pe culturi de ţesuturi, în monostrat în cutii Petri şi numărul particulelor vii din vaccin este evaluat după capacitatea infectivă a diluţiei.

Testele de protecţie au importanţă deosebită deoarece majoritatea vaccinurilor sunt obţinute din materiale cu patogenitate deosebite (ex. doza letală a toxinei tetanice pentru şoarece a fost evaluată ca fiind $3x10^{-5}\mu g$).

Vaccinurile noi, aflate în stadiu de cercetare sunt testate pe animale, pentru a demonstra producerea răspunsului imun, capacitatea de a proteja gazda şi siguranţa în administrare. In final, vaccinurile cu utilizare umană trebuie testate pe oameniAspectele care privesc produsul sunt:

- vaccinul să fie imunologic şi sigur
- vaccinul să fie eficient în condiţii controlate
- vaccinul să fie eficient în reducerea prevalenţei bolii în populaţie.

După studiile clinice în comunitate (1.000-10.000 de vaccinări) se poate solicita eliberarea licentei, care nu garantează că vaccinul nou este complet sigur şi prin urmare trebuie urmărite eficienţa şi apariţia eventualelor efecte adverse. Prin aceste teste se urmăreşte dacă fiecare serie a fiecărui produs, în etapa finală corespunde testelor de protecţie recomandate de farmacopee.

Vaccinurile bacteriene sunt supuse unor teste de verificare a siguranţei în administrare, mai simple. Vaccinurile care conţin bacterii omorâte sunt verificate pentru a stabili dacă lipsesc total formele vii, prin inocularea produsului final pe medii de cultură. Vaccinurile care conţin toxina tetanică sau difterică sunt verificate suplimentar printr-un test care pune în evidenţă detoxifierea necorespunzătoare a toxinei; întotdeauna este inoculat cobaiul care este sensibil la ambele toxine. Inocularea mai urmăreşte şi eventuala prezenţă în vaccinul BCG a altor bacterii patogene.

Pentru vaccinurile virale, problema siguranţei în administrare este mai complexă. Vaccinurile preparate din virusuri omorâte pot conţine forme vii care nu au fost inactivate şi testele efectuate urmăresc detectarea acestora prin inocularea culturilor de celule sau a animalelor sensibile. Culturile de celule sunt examinate pentru efectul citopatic, iar animalele pentru simptomele bolii şi prezenţa modificărilor histologice.

Aceste teste sunt foarte importante pentru verificarea vaccinului inactivat poliomielitic. Vaccinul este inoculat intraspinal la maimuţă şi după autopsie, secţiuni din creier şi măduva spinării sunt examinate pentru detectarea leziunilor histologice care indică proliferarea virusului.

În cazul vaccinurilor cu virusuri atenuate există posibilitatea ca, pe durata obţinerii, să aibă loc o reversie a virusului, care devine virulent şi este capabil să producă infecţia în urma vaccinării. Această posibilitate este verificată cu mare atenţie, mai ales în cazul vaccinului cu virus atenuat al poliomielitei; neurovirulenţa vaccinului este comparată cu cea a vaccinului a cărui siguranţă în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

administrare este cunoscută. Inocularea intraspinală a maimuțelor cu vaccin de referință și vaccin test poate evidenția simptomele și leziunile neurologice produse de un vaccin necorespunzător.

Teste generale

Testele de sterilitate. În general vaccinurile sunt sterile, exceptând vaccinul variolei, obținut din dermul animalelor și vaccinurile bacteriene, cum ar fi BCG, vaccinul tifoid Ty21A și vaccinul tularemiei care conțin microorganisme vii atenuate. Standardele OMS precizează numărul de containere care trebuie testate din fiecare serie pentru verificarea sterilității. Metoda uzuală este filtrarea prin membrană, care permite testarea unor volume mari, fără a dilua mediul test și totodată poate detecta, prezența fungilor, a bacteriilor aerobe și anaerobe.

Verificarea toxicității. Testul este simplu și urmărește prezența în containerul final a unui eventual contaminant cu toxicitate ridicată. Cinci șoareci (17 – 22g) și doi cobai (250 – 350g) sunt inoculați cu o doză umană sau 1,0ml din produsul de testat. Toate animalele trebuie să supraviețuiască 7 zile, fără semne de boală.

Prezența aluminiului și calciului. Vaccinurile care conțin ca adjuvanți hidroxid de aluminiu și fosfat de aluminiu nu trebuie să conțină mai mult de 1,25mg per doză aluminiu; cantitatea de calciu este limitată la 1,3mg per doză și se evaluează spectrofotometric.

Formalina liberă. În produsul final sunt prezente cantități de formalină rămase de la inactivarea toxinelor bacteriene; cantitatea acesteia, determinată prin reacția de culoare cu acetilacetonă, nu trebuie să depășească 0,02%.

Concentrația de fenol. Fenolul este utilizat pentru prezervarea vaccinurilor și nu trebuie să depășească concentrația de 0,25% m/v sau, pentru unele vaccinuri, 0,5% m/v. Evaluarea se face prin reacția de culoare cu amino-fenazonă și hexacianoferat.

Imunoserurile

Imunoserurile sunt preparate obținute din sângele unor animale, obișnuit din sângele de cal. Caii sunt injectați cu doze spațiate de antigen până când probele de sânge prelevate conțin un titru ridicat de anticorpi ca răspuns la antigenul inoculat. Sângele este recoltat prin puncție venoasă într-un recipient ce conține o soluție de citrat pentru a evita coagularea. Hematiile se depun și plasma este extrasă. Plasma este apoi fracționată prin adiționare de sulfat de amoniu și fracția globulinică

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este recuperată şi tratată cu pepsină pentru a se obţine imunoserul (Harms, 1948). Îmunoserul purificat conţine doar urme de albumină care este prezentă în plasmă.

Conţinutul în anticorpi este determinat şi imunoserul diluat în concentraţiile necesare, se repartizează în fiole. Două sau mai multe imunoseruri monovalente se pot amesteca pentru a obţine un imunoser polivalent.

Controlul de calitate urmăreşte eficienţa, sterilitatea şi siguranţa în administrare a imunoserurilor. Eficienţa este evaluată prin compararea cantităţilor de imunoser test şi imunoser standard necesare neutralizării antigenului corespunzător.

Se efectuează diluţii seriate din imunoserul test şi imunoserul standard la care se adaugă cantităţi egale de antigen omolog. Fiecare amestec este inoculat unui grup de animale (şoareci, cobai) şi se notează diluţiile de imunoser test şi imunoser standard care au efect neutralizant asupra antigenului. Dacă puterea imunoserului standard este exprimată în UI, puterea imunoserului test se determină în unităţi per mililitru (British Pharmacopeia, 1993).

În Tabelul 15.3 sunt prezentate imunoseruri utilizate actual, activitatea pe care o posedă şi metodele de evaluare a eficienţei.

Tabel 15.3 Imunoseruri utilizate în prevenirea unor infecţii ale omului

Imunoser	Metoda de dozare	Activitatea necesară
Antitoxina botulinică	Neutralizarea efectului letal al toxinelor A, B şi E pe şoarece	500 UI/ml pentru tipul A 500 UI/ml pentru tipul B 500 UI/ml pentru tipul E
Antitoxina difterică	Neutralizarea efectului eritrogen al toxinei difterice pe tegumentul de cobai	1000UI/ml dacă este preparată pe cal 500UI/ml dacă este preparată pe altă specie
Antitoxina tetanică	Neutralizarea efectului paralizant al toxinei tetanice pe şoarece	1000UI/ml pentru profilaxie 3000UI/ml pentru tratament

Pentru fiecare dozare este deteminată cantitatea de imunoser şi de antitoxină standard necesară pentru neutralizarea efectelor unei doze cunoscute. Pentru calculul activităţii imunoserului sunt necesare două determinări; activitatea se exprimă în unităţi internaţionale (UI).

Imunoglobulinele umane

Sunt obţinute din imunoglobuline, mai ales imunoglobuline G (IgG) prezente în sângele uman. Se obţin din plasma donatorilor de sânge prin plasmaforeză.

Imunoglobulina normală este preparată din plasma obţinută de la aproximativ 1 000 de indivizi; imunoglobulinele specifice, care au un titru ridicat de anumiţi anticorpi, se prepară din cantităţi mici de plasmă obţinute de la indivizi cu o infecţie recentă sau care au fost recent imunizaţi

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

şi care au un titru ridicat al anticorpilor. Fiecare cantitate de plasmă este verificată pentru decelarea antigenului de suprafață al hepatitei B (HBsAg), pentru anticorpii virusului imunodeficienței umane I şi II (HIV I şi II) şi pentru anticorpii hepatitei cu virus C, pentru a exclude posibilitatea transmiterii infecției de la donator la receptor.

Imunoglobulinele se obțin din plasmă, prin fracționare şi precipitare cu etanol la rece; concentrația proteinelor, a ionilor şi pH-ul sunt riguros controlate. O parte din fracțiuni contribuie la protejarea imunoglobulinelor prin inactivarea sau îndepărtarea virusurilor care au fost identificate prin testele la care a fost supus sângele donatorilor.

În preparatele lichide sau liofilizate concentrația imunoglobulinelor trebuie să fie de 10 – 20 ori mai mare ca în plasmă. Ca stabilizator se foloseşte glicina iar drept prezervant – tiomersalul.

Controlul de calitate al imunoglobulinelor constă în testarea eficienței, sterilității şi sigurantei în administrare. Pentru eficiență se practică testele de neutralizare. Pe lângă testele de sterilitate se mai fac determinări ale concentrației de azot, ale compoziției proteinelor prin electroforeză pe acetat de celuloză şi determinarea greutății moleculare prin cromatografie în lichid. Prezența imunoglobulinelor provenite de la alte specii decâte omul este detectată prin teste de precipitare. Imunoglobulinele utilizate în terapia infecțiilor umane, activitatea lor şi metodele de determinare a eficienței sunt prezentate în Tabelul 15.4.

Pentru fiecare dozare se determină cantitatea de imunoglobulină şi cantitatea din standardul corespunzător necesară pentru neutralizarea infectivității (sau altei activități biologice) unei cantități definite de virus sau toxină bacteriană. Pentru calcularea activității imunoglobulinelor (în unități internaționale, UI) sunt necesare două determinări ELISA: (enzyme – linked immunosorbent assay).

Tabel 15.4 Imunoglobulinele utilizate în prevenirea şi terapia infecțiilor la om.

Imunoglobulina	**Metoda de determinare a activității**	**Activitatea necesară**
Hepatita B	Dozare radioimună sau imunoenzimatică	Nu mai mică de 100UI/ml
Rujeola	Neutralizarea infectivității virusului rujeolei pe culturi de celule	NU mai mică de 50UI/ml
Normala	Testul de neutralizare pe culturi de celule sau pe animale	Evaluarea cantitativă a unui tip de anticorpi bacterieni şi a unui tip de anticorpi virali pentru care există standarde internaționale
Rabia	Neutralizarea infectivității virusului rabiei pe şoarece	Nu mai mică de 150UI/ml
Tetanos	Neutralizarea efectului paralizant al toxinei tetanice pe şoarece	Nu mai mică de 50UI/ml
Varicela/Zoster	ELISA în paralel cu standardul imunoglobulinei Varicela-Zoster	Nu mai mică de 100UI/ml

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Produsele imunologice, mai ales vaccinurile asigură o protecție sigură față de toxinele bacteriene şi virusuri; protecția este mai scăzută în cazul unui număr mare de bacterii patogene. Există o corelație inversă între eficiența vaccinurilor şi dimensiunea patogenului. Această relație reflectă modul în care anticorpii induşi de vaccin reacționează cu toxina sau cu bacteria patogenă. Moleculele mici de toxină tetanică pot fi complet neutralizate de moleculele antitoxinei tetanice. Dimpotrivă, parazitul malariei nu este afectat de anticorpii care atacă doar componente ale celulei care nu sunt esențiale pentru supraviețuirea parazitului.

S-a sugerat că pentru a obține vaccinuri eficiente asupra unor patogeni mari, trebuie găsite moleculele care sunt esențiale pentru supraviețuirea lor. Un vaccin care conține asemenea molecule ar putea induce formarea de anticorpi cu acțiune asupra moleculelor esențiale şi astfel ar fi posibilă obținerea imunității față de patogenii cu dimensiuni mari.

Costul vaccinurilor utilizate în imunizarea de rutină a copiilor şi adolescenților este echivalent cu costul a 100 de pâini. În țările industrializate acest preț este mic şi asigură o protecție pe termen lung față de difterie, tetanos, tuse convulsivă, infecția cu *Haemophilus influenzae* tip B, poliomielită, oreion, pojar, rubeolă.

În țările dezvoltate acest preț este parțial suportat de individ şi de autoritățile care supraveghează starea de sănătate a populației, dar cea mai mare parte din cost este alocată de OMS prin programele de imunizare. De la stabilirea programului extins de imunizare al OMS, nivelul de imunizare pentru 6 vaccinuri esențiale pentru copii a crescut de la 5% la începutul anilor '80 la circa 80%, actual, pe tot globul. Anual sunt prevenite peste 2,7 milioane decese prin rujeolă, tetanos neonatal, tuse convulsivă şi 200.000 de cazuri de paralizie cauzată de poliomielită.

Totuşi, multe boli care pot fi prevenite prin vaccinuri sunt prevalente în țările în curs de dezvoltare. De exemplu, rujeola face annual aproximativ 1,5 milioane de victime în rândul copiilor. Evaluările arată că 20-35% din totalul deceselor la copii cu vârsta sub 5 ani sunt cauzate de boli care pot fi prevenite prin vaccinuri.

Bibliografie

British Pharmacopeia London. *Her Majesty's Stationary Office*, 1993.

Harms AJ. *The purification of antitoxic plasmas by enzyme treatament and heat denaturation*. Biochem J, 42, 340-347, 1948.

She

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16

Vaccinarea şi imunizarea

Vaccinarea antivariolică, iniţiată de Jenner acum două secole a deschis calea utilizării vaccinurilor în profilaxia bolilor transmisibile, contribuind la sănătatea oamenilor şi a animalelor.

Descoperirile lui Pasteur referitoare la atenuarea virulenţei agenţilor patogeni au făcut posibilă obţinerea primului vaccin, bazat pe principii imunologice şipunerea la punct a unor noi tehnici: cultivarea pe oul embrionat, culturi de celule in vitro, perfecţionarea metodelor de cultivare a bacteriilor.

Vaccinarea a permis eradicarea, pe plan mondial a variolei şi controlul unor boli grave, cu largă răspândire: poliomielita, rujeola, febra galbenă. Pentru societatea de azi, imunizarea reprezintă unul din mijloacele cele mai eficiente din punct de vedere al raportului cost-eficienţă în prevenirea bolilor infecţioase severe.

Omul este afectat rareori a doua oară de aceeaşi boală infecţioasă: doar când reinfecţia este dată de o tulpină modificată antigenic (virusul gripal), când pacientul este imunocompromis sau când a trecut mult timp de la prima infecţie.

Definiţii

Termenul de *vaccinare* este utilizat pentru a desemna măsurile profilactice care utilizează microorganismele vii, atenuate sau omorâte sau produsele acestora administrate unei gazde potenţiale în scopul inducerii imunităţii şi a prevenirii bolii.

La modul general termenul de *imunizare* se referă la procedeele de inducere a imunităţii la un receptor, dar fără a fi necesară utilizarea microorganismelor. Astfel imunizarea activă se referă la inducerea apărării imune prin administrarea de vaccinuri sau anatoxine iar imunizarea pasivă oferă protecţie temporară prin administrarea de substanţe imune produse exogen.

Agenţii de imunizare includ vaccinuri, anatoxine şi preparate imuno-globulinice (Ig), antitoxine şi seruri care conţin anticorpi de la donatori umani sau animali.

Anatoxina este un preparat obţinut dintr-o toxină bacteriană prin acţiunea simultană a formolului şi căldurii, care şi-a pierdut capacitatea toxică dar şi-a menţinut proprietăţile imunizante.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Globulina imună este o soluție care conține anticorpi, obținuți din sânge uman prin fracționare la rece cu etanol a unor cantități mari de plasmă. Se folosește pentru menținerea imunității la persoane imunodeficiente sau pentru imunizare pasivă.

Antitoxina este un anticorp derivat din serul animalelor după stimularea cu antigeni specifici (toxină difterică, tetanică, etc.) sau a unui venin, folosită pentru obținerea imunității pasive.

Procedeele de vaccinare și imunizare sunt utilizate atât pentru protecția individuală față de infecții cât și pentru protecția comunității față de bolile epidemice.

Răspândirea infecției

Bolile infecțioase se pot răspândi dintr-un rezervor comun al agentului infecțios (sursa comună) sau se transferă direct de individul bolnav la unul sănătos (sursa de propagare).

Sursa comună de infecție

În cazul sursei comune de infecție, rezervorul infecției poate fi animat (ex. insecte vectori ai malariei și febrei galbene) sau neanimat (apa și alimentele contaminate, instalațiile de climatizare). Uneori sursa de infecție este tranzitorie (ex. sursa de hrană) și în acest caz apariția de noi cazuri este rapidă, cu o incubație de 1 – 1,5 perioade și apariția noilor cazuri scade rapid după eliminarea sursei. Aceste izbucniri epidemice acute ale infecției sunt limitate social și geografic. Dacă sursa infecției persistă, după izbucnire, incidența noilor cazuri se menține la un nivel care este determinat de infectivitatea agentului patogen și frecvența de expunere a indivizilor (Fig.16.1).

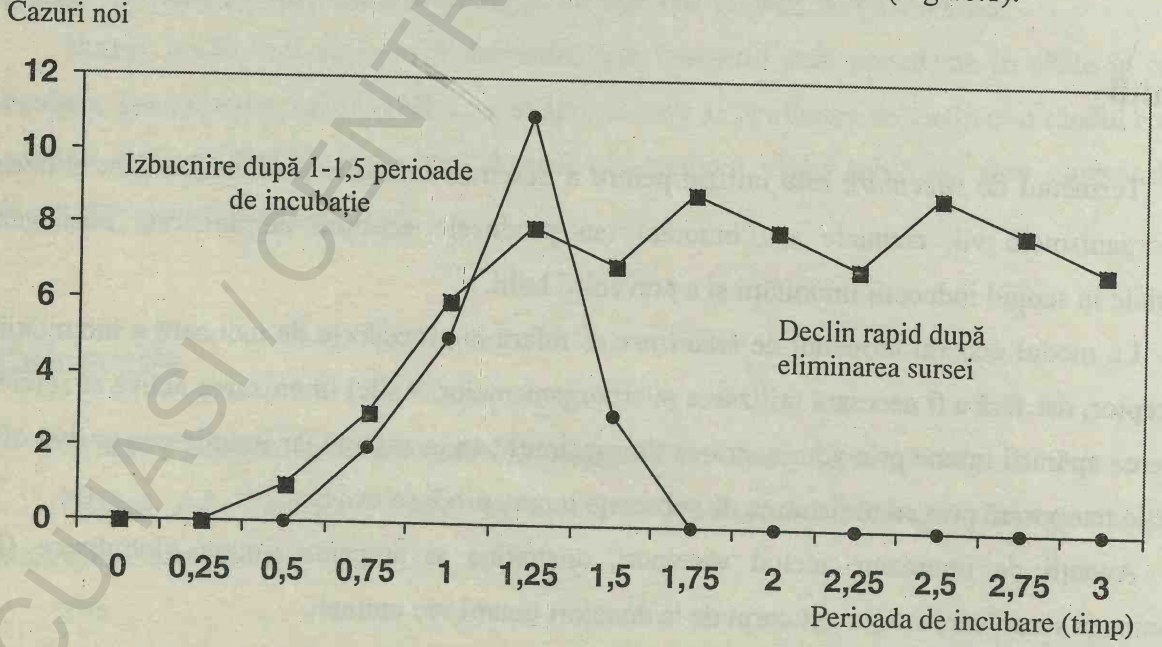


Fig.16.1 Incidența izbucnirilor cu sursă comună de infecție în cazul unor surse persistente (■) și a celor de scurtă durată (●).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diagnosticarea primului caz de infecție Creutzfeld – Jacob în 1990, asociat cu consumul de carne infectată, provenită de la bovinele cu encefalopatie spongiformă identificată în 1980, sugerează că incidența acestei boli va creşte după 1 –1,5 perioade de incubație (ex. 10 – 15 ani) şi va persista mulți ani până la declin. Conform acestui scenariu, plecând de la o singură sursă comună epidemică, infecția poate persista până în mileniul următor.

În cazul infecțiilor transmise omului prin insecte, fazele de izbucnire şi declin ale epidemiei sunt înregistrate după variațiile sezoniere ale prevalenței insectelor.

Aceste boli sunt controlate prin măsuri privind sănătatea publică şi controlul mediului de viață al vectorului, vaccinarea şi imunizarea având drept scop protecția indivizilor.

Infecțiile din surse propagate

Izbucnirile din surse propagate sunt asociate cu transmiterea directă a agentului infecțios de la individul bolnav la cel sănătos, prin mecanisme cum ar fi inhalarea aerosolilor infectați (oreion, difterie, rujeolă), contactul fizic direct (sifilis, virusul herpesului) şi contaminarea fecală a apei şi alimentelor (holeră, febra tifoidă) când standardele de igienă sunt nerespectate. Transmiterea se face uşor şi frecvența izbucnirii epidemiilor se asociază nu numai cu starea de receptivitate şi de sănătate generală a individului dar şi cu virulența agentului patogen, calea de transmitere, durata perioadei de infecție asociată cu boala, vârsta populației din grup, densitatea indivizilor (mediu urban sau rural), (Fig.16.2).

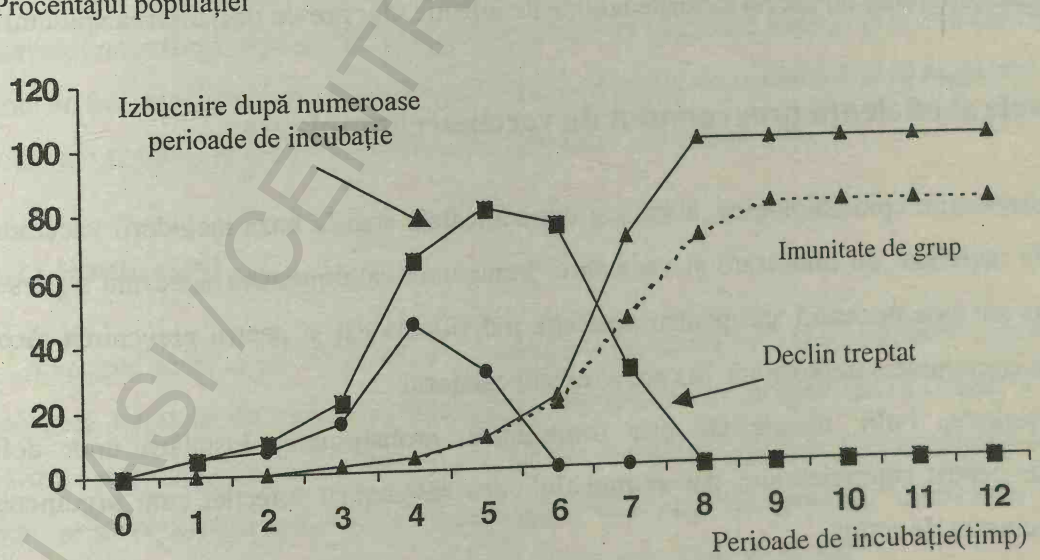


Fig.16.2 Izbucnirile propagate ale infecției indică incidența de noi cazuri (●), indivizi bolnavi (■) şi dobândirea imunității (▲). Linia punctată indică propagarea pentru grupuri incomplete, amestecate, de indivizi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fiecare individ infectat poate transmite boala altei persoane receptive, dacă vine în contact cu ea în perioada infecţioasă. Numărul persoanelor care pot fi infectate de un singur individ depinde de densitatea populaţiei şi receptivitatea acesteia, de natura relaţiilor sociale, de durata şi sincronizarea perioadei de infecţie. Boala se răspândeşte mai repede dacă infecţia nu este urmată imediat de manifestări caracteristice. Astfel, fiecare individ infectat este la rândul său o sursă de infecţie, încât incidenţa bolii creşte exponenţial. În Figura 2 este prezentat teoretic incidenţa infecţiei în cadrul unui grup de indivizi, perfect amestecaţi şi receptivi la infecţie. Modelul de infecţie are o perioadă de incubaţie de o zi şi o perioadă infectivă de 2 zile începând de la declanşarea simptomelor şi vindecare, o zi mai târziu. Conform graficului fiecare individ infectat contaminează alte două persoane pe zi până când tot grupul contractează boala. In realitate însă rata transmiterii descreşte pe măsură ce epidemia progresează deoarece indivizii însănătoşiţi devin imuni la o nouă infecţie şi se reduce astfel numărul indivizilor receptivi din populaţie. Adesea epidemiile încetează înainte ca toţi membrii comunităţii să fie infectaţi (Figura 2, linia întreruptă). Dacă proporţia indivizilor imuni din grup se menţine ridicată, peste un anumit nivel, atunci probabilitatea apariţiei unei epidemii, plecând de la un singur incident infecţios este mică. Acest nivel de prag este corelat cu infecţiozitatea agentului şi densitatea populaţiei.

Izbucnirile de rujeolă tind să apară anual la sfârşitul verii printre copiii care merg prima oară la şcoală, ca efect al concentrării indivizilor receptivi în acelaşi spaţiu şi în acest fel se reduce proporţia subiecţilor imuni sub pragul de propagare a infecţiei.

Programul de vaccinare menţine totuşi proporţia indivizilor imuni la infecţie peste nivelul critic. Aceste programe nu previn cazurile izolate de infecţie, dar previn declanşarea epidemiilor.

Obiectivele şi eficienţa programului de vaccinare/imunizare

Observaţiile epidemiologice, clinice şi experimentale stau la baza includerii vaccinurilor în programele naţionale de imunizare şi vaccinare. Imunizarea suplimentară adecvată a persoanelor care călătoresc este necesară atât pentru protecţia individuală cât şi pentru prevenirea răspândirii infecţiei în comunitatea neprotejată, în care a revenit călătorul.

Severitatea bolii, manifestată prin morbiditate, probabilitatea instalării unor deficienţe permanente pentru supravieţuitor, dar şi probabilitatea răspândirii infecţiei sunt argumente care impun vaccinarea de rutină.

Prin programele de vaccinare şi imunizare rareori se asigură protecţie de 100% asupra unei anumite boli; gradul de protecţie oferit este de 60 – 95%. După vaccinare, când probabilitatea imunizării este mare, virtual proporţia receptivilor trebuie să fie sub pragul de răspândire epidemică

a infecției. Profilaxia antidifterică și antitetanică, care utilizează toxoidele este unul din cele mai eficiente programe de imunizare, iar vaccinul omorât pentru holeră, asigură o protecție redusă care este utilizat pentru combaterea epidemiilor.

Siguranța în administrare

Nici o procedură medicală sau terapeutică nu este lipsită de riscuri pentru pacient. Riscurile asociate cu procedurile de imunizare sunt puse în balanță cu riscurile contractării bolii. Astfel, în Anglia s-a renunțat, la mijlocul anilor 1970, la vaccinarea împotriva variolei, deoarece riscurile asociate cu vaccinarea depășeau numărul deceselor prin importarea bolii. La scurt timp, în 1980, organismele de supraveghere a sănătății publice, au declarat eradicarea variolei. De asemenea, incidența poliomielitei în America și Anglia, în 1996 a scăzut foarte mult, majoritatea cazurilor apărute fiind asociate cu utilizarea vaccinului.

Încrederea populației în siguranța vaccinării și imunizării este esențială. După reținerea publică față de vaccinul tusei convulsive, din anul 1970, când imunizarea a acoperit 30 – 80%, încrederea populației a fost redobândită prin asigurarea imunității în peste 92% din cazuri.

Costul vaccinării

Prețul de cost mic al vaccinurilor reprezintă un aspect esențial în lupta cu bolile infecțioase. În 1996, costul programului de vaccinare al copiilor, orientat asupra poliomielitei, difteriei, tusei convulsive, tetanosului, rujeolei și tuberculozei a fost de 1$ pentru vaccinuri și 14$ pentru program. Vaccinurile noi, mai ales cele obținute prin tehnici de inginerie genetică sunt mult mai scumpe și perspectiva includerii în programele de imunizare este mai îndepărtată.

Durata imunizării

Vaccinul ideal ar trebui să asigure protecția individuală pe o perioadă îndelungată. Memoria imunologică depinde de supraviețuirea populației de celule B mici și limfocite T (celule cu memorie). Limfocitele mici au o durată de viață în corp de 15 – 20 ani. Dacă sistemul imun nu este solicitat prin expunerea naturală a organismului sau prin reimunizare, imunitatea căpătată în copilărie se poate atenua sau dispare complet în jurul vârstei de 30 de ani.

Vaccinurile care asigură o protecție scăzută împotriva infecției au o eficiență limitată în timp. Vaccinul febrei galbene, care are eficiență ridicată trebuie repetat la intervale de 10 ani; vaccinul tifoid are eficiență nunmai pentru 1 – 3 ani. Chiar dacă imunizarea are sau nu loc în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

copilărie, este solicitată în adolescență și viața adultului depinde de vârsta la care apare riscul infecției.

Imunitatea la infecție poate fi dobândită pasiv, prin transferul de anticorpi preformați, protectori sau poate fi dobândită activ, în urma răspunsului imun ca urmare a expunerii accidentale sau deliberate la acțiunea unui microorganism sau a unor părți componente ale acestuia. Imunitatea dobândită activ determină răspunsul umoral și mediat celular sau numai unul dintre acestea.

Imunitatea dobândită pasiv

Anticorpii umorali de clasă IgG trec prin placentă de la mamă la făt și prin colostrum de la mamă la noul născut. Acești anticorpi asigură protecția pasivă a noului născut față de bolile la care mama este imună. În acest fel nou născutul poate fi protejat împotriva tetanosului dar nu și față de tuberculoză care necesită o imunitate mediată celular. Anticorpii transferați prin colostrum asigură protecția pasivă fața de infecțiile tractusului gastro-intestinal.

Anticorpii dobândiți de la mamă reacționează cu antigenele care au cauzat o infecție dar și cu antigenele introduse în organism în urma programelor de imunizare. Durata imunizării pasive, materne este scurtă, de 3 – 6 luni și imunizarea precoce, înaintea catabolizării anticorpilor materni, diminuează eficiența vaccinurilor administrate.

Imunizarea pasivă este în general folosită pentru a asigura imunitate temporară unui subiect neimunizat, expus la o boală infecțioasă, atunci când imunizarea activă nu este disponibilă (ex. Hepatita A) sau nu s-a efectuat înaintea expunerii (rabia). De asemenea este aplicată în anumite boli asociate cu toxine (difteria) sau mușcături (șarpe, păianjen).

Administrarea de anticorpi preformați, obținuți de la animale, din serul uman sau pe linii de celule umane, se face în scopul tratării unei infecții existente (tetanos, difterie) sau când sunt condițiile dobândirii infecției.

Imunitatea dobândită activ

Imunitatea dobândită activ se instalează prin expunerea sistemului imun la compuși antigenici, fie în urma infecției; fie prin vaccinare asociată cu infecția sau prin introducerea directă a antigenelor omorâte în organism. Calea de expunere la antigen influențează natura răspunsului imun: dacă antigenul este injectat, se produc mai întâi IgG și IgM; dacă expunerea este la nivel epitelial (intestin, tractus respirator) se produc anticorpi secretori (IgA, IgE) dar are loc și stimularea anticorpilor umorali.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Intensitatea şi specificitatea răspunsului imun depind de durata expunerii la antigen, raportul concentraţie-timp, de stările fizice şi chimice ale antigenului, de modul de administrare, rata degradării antigenului, caracteristicile genetice ale primitorului şi alţi factori care ţin de gazdă. Vârsta indivizilor influenţează răspunsul la vaccinuri. Nivelurile înalte de anticorpi materni şi/sau imaturitatea sistemului imun în primele luni de viaţă influenţează negativ răspunsul imun iniţial la unii antigeni. La vârstnici, răspunsurile la vaccinuri pot fi diminuate datorită declinului natural al sistemului imun. Ca urmare sunt necesare cantităţi mai mari de antigen pentru a obţine răspunsul eficient (exemplu: gripa).

Nivelurile antigenului sunt foarte mici în cazul infecţiilor naturale, iniţial şi localizate la poarta de intrare a gazdei. Aceste cantităţi mici de antigen reacţionează cu grupul limfocitelor mici care se transformă şi produc diferite clase de anticorpi specifici antigenelor, împreună cu celulele B şi T. Pe măsură ce microorganismele eliberează cantităţi tot mai mari de antigene şi infecţia progresează răspunsul imun reacţionează prin creşterea numărului de limfocite care produc cantităţi mari de anticorpi. Este posibil ca numărul anticorpilor să fie suficient pentru a elimina microorganismul care a produs infecţia. În urma contactului cu antigenul, organismul dobândeşte o reactivitate deosebită a celulelor cu memorie imunologică, încât la un nou contact cu acelaşi antigen, va reacţiona prompt stopând evoluţia infecţiei.

Această situaţie se deosebeşte de cazul injectării unui imunogen care nu se replică. Deseori cantitatea de antigen introdusă este mai mare comparativ cu nivelul obţinut în stadiul iniţial al infecţiei naturale. La animalele neimunizate, aceste antigene reacţionează atât cu limfocitele care produc anticorpi înalt specifici, cât şi cu cele a căror specificitate este scăzută. Răspunsul imun încetează după inocularea iniţială; la o a doua inoculare a antigenului el reacţionează prin anticorpii preformaţi la prima administrare împreună cu un subgrup specific de limfocite.

Pe măsură ce numărul inoculărilor creşte, se măreşte şi proporţia limfocitelor specifice. După un număr sucifient de inoculări consecutive, amploarea şi specificitatea răspunsului imun pot asigura eliminarea antigenului în cazul unei infecţii naturale. Expunerea la antigen pune anumite probleme:

- imunogenul introdus reacţionează preferenţial cu anticorpii preformaţi şi nu cu limfocitele şi de aceea este necesară existenţa unui interval suficient între expuneri pentru a avea loc scăderea naturală a anticorpilor;
- imunitatea la infecţie este completă numai după ultima inocularea a imunogenului;
- specificitatea redusă a anticorpilor produşi în etapa iniţială a expunerii la antigen poate determina reacţia cu ţesuturile gazdei, producând reacţii adverse la vaccin.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clasele de vaccinuri

Vaccinurile sunt constituite din microorganisme vii, cu virulența atenuată, microorganisme omorâte sau din componente purificate virale sau bacteriene.

Vaccinurile vii

Microorganismele care intră în componența vaccinurilor vii, au virulența atenuată prin trecerea pe organisme gazdă nespecifice, prin cultivarea repetată pe culturi de celule animale până când, inoculate pe specii sensibile nu mai produc boala.

Atenuarea virulenței se produce până la un nivel scăzut, care nu dăunează organismelor vaccinate, dar cu menținerea infecțiozității și a capacității de replicare, care să stimuleze producerea unui răspuns imun eficient.

Utilizarea vaccinurilor atenuate are două mari avantaje. Vaccinarea cu microorganisme atenuate mimează o infecție naturală ușoară sau asimptomatică, în cursul căreia, replicarea asigură eliberarea unei cantități mari de determinanți antigenici, care stimulează celulele sistemului imunitar. Adminstrarea pe calea naturală de pătrunderea infecției (ex. oral) stimulează un răspuns imun adecvat unei anumite infecții (ex. anticorpi secretori ca mecanism de apărare primară față de virusul poliomielitei, în intestin).

Vaccinurile atenuate antrenează participarea tuturor țesuturilor cu rol imunologic, declanșând reacțiile imunitare mediate umoral și celular.

Frecvent o singură doză asigură instalarea unei imunități eficiente. Excepție face vaccinarea antipoliomielitică orală (Sabin) care necesită trei administrări, la interval de o lună. Schema de vaccinare este motivată de tendința celor trei tipuri de virus din vaccin de a intra în competiție în cursul multiplicării în intestin. La prima imunizare predomină un tip de virus iar celelalte devin dominante prin administrările ulterioare.

Dezavantajul major al vaccinurilor atenuate decurge din faptul că administrate pe calea naturală a infecției, după multiplicări repetate, pot reveni la virulența inițială și se pot transmite altor indivizi. Dacă atenuarea se diminuează, microorganismul își recapătă puterea patogenă. Acest mecanism ar putea justifica cele 102 cazuri de poliomielită, asociate cu vaccinarea, consemnate în America, între anii 1969 – 1980. Un alt dezavantaj al vaccinurilor vii este că în timpul acțiunii lor poate fi afectat statusul imunologic al pacientului.

Vaccinurile atenuate prezintă riscul de a conține alte virusuri contaminante, provenite din sistemul de cultivare.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Administrarea virusurilor atenuate este contraindicată la gravide, pentru a nu afecta fătul al cărui sistem imunitar nu este încă eficient, la persoanele cu deficienţe ale sistemului imunitar, iradiate, leucemice.

Vaccinurile omorâte şi preparate din componente purificate microbiene

Vaccinurile inactivate nu produc profilul natural al infecţiei dar induc formarea de anticorpi specifici cu rol protector care asigură o stare de imunitate temporară faţă de agentul patogen din care au fost preparate.

Capacitatea imunologică este scăzută, limitată mai ales la producerea de anticorpi. Aceste vaccinuri conţin cantităţi mari de componente neimunogene, care depăşesc ponderea constituienţilor ce asigură protecţia eficientă şi cresc posibilitatea apariţiei unor reacţii adverse: durere, reacţii locale, hipersensibilitate faţă de proteine străine, antibiotice, preservanţi, etc.).

Terapia de rutină cu produse imune

Utilizarea vaccinurilor

Vaccinurile recomandate de Comitetul consultativ privind procedee de imunizare, Academia americană de Pediatrie şi Colegiul american al medicilor pentru folosirea de rutină la sugari, copii şi adulţi şi cele de uz special sunt prezentate în Tabelul 16.1 şi Tabelul 16.2.

Programele de administrare a vaccinurilor recomandate pentru sugari şi copii sunt prezentate în Tabelul 16.3. In mod curent toţi copiii primesc, dacă nu sunt contraindicaţii, vaccinurile DTP, polio, rujeolic, rubeolic, oreionic, vaccinul *H. influenzae* tip b şi HBV.

Adulţii trebuie să fie imuni la difterie şi tetanos. Dacă anterior nu au fost imunizaţi se impune o cură de imunizare primară de trei doze de TD (a două doză se face la 4-8 săptămâni iar a treia la 12 luni). Rapelurile se fac, la fiecare 10 ani. Dacă până la un an nu au făcut boala şi nu au fost vaccinaţi trebuie protejaţi de rujeolă, rubeolă şi oreion. Vaccinul rubeolic se administrează tuturor femeilor fertile care nu au fost imunizate în copilărie.

Reacţii adverse după vaccinare

Deşi sigure şi eficiente, vaccinurile sunt asociate cu efecte adverse care pot fi uşoare sau foarte severe. Unele persoane care au primit o cură completă de vaccin sau anatoxină pot să dezvolte boala. Decizia de a folosi un vaccin necesită evaluarea riscurilor bolii şi a beneficiilor vaccinării.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 16.1 Vaccinuri de rutină penrtu sugari , copii şi adulţi

Vaccin	Tipul	Calea de administrare recomandată	Eficienţă	Efecte adverse
Anatoxinele difterică, tetanică şi vaccinul pertussis Anatoxinele difterică, tetanică, pediatrice Anatoxinele difterică şi tetanică pentru adulţi	Anatoxine şi bacterii întregi inactivate	Intramuscular	Difteric= 95% Pertussis=80% Tetanic=95%	Reacţii locale frecvente acute hipotonice, hiporeactive, encefalopatie acută (DTP) Reacţie arthus-like la persoane care au primit rapeluri
Pertussis acelular	Antigen bacterian inactivat	Intramuscular		Reacţie locală redusă
Haemophilus influenzae tip b	Polizaharide bacteriene conjugate cu proteine	Intramuscular	90%	Reacţii locale 10%; fără reacţii severe
Hepatita B	Antigen viral inactivat	Intramuscular	80-95%	Reacţii locale uşoare
Gripa	Componente virale sau virusuri inactivate	Intramuscular	40-70%	Reacţii locale uşoare. Sindrom Guillain-Barre asociat cu gripa porcină; rare reactii alergice la pacienţi alergici la ouă.
Vaccinuri combinate ale virusurilor rujeolei, oreionului şi rubeolei	Virusuri vii	Subcutanat	Rujeolă=95% Oreion=95% Rubeolă=95%	Encefalopatie acută (rujeolă) Rar parotidită şi orhită Artralgie (40%); artrită (<2%); febră 5-15% după 5-21 zile de la vaccinare; 5% urticarie
Polisaharidul pneumococic	23 tipuri de polisaharide bacteriene	Intramuscular sau subcutanat	60-80%	Reacţii locale-50% (durere); rar anafilaxie
Poliomielita Virusul oral polio	Trei serotipuri de virusuri vii	Oral	95%	Rar poliomielită asociată vaccinului
Virusul polio inactivat amplificat (VPI)	Trei serotipuri de virusuri inactivate	Subcutanat	95%	Fără efecte semnificative

BCU "IOAN SLAVICI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 16.2 Vaccinuri de uz special

Vaccin	Anul intrării în uz	Tipul agentului imunizant	Calea de administrare	Indicații	Eficiență	Efecte adverse
Adenovirusuri de tip 4 și 7	1980	Virusuri vii, neatenuate	Oral	Numai pentru recruții militari	>90%	Absente, îngeneral
Antrax	1970	Bacterii nevirulente inactive	Subcutanat	Pentru persoane cu risc (care prelucrează piei de animale, blană, lână, făină de oase)	90% răspuns la anticorpi, dar eficiența este nesigură	Nu se cunosc reacții adverse severe
Tuberculoză (BCG)	1950	Bacterii vii	Intradermic	Indivizi în contact prelungit cu pacienți cu tuberculoză activă	Controversată, reduce boala diseminată în copilărie	Frecvent febră, durere locală, tumefacție
Holeră	1914	Bacterii inactivate	Subcutanat sau intradermic	Neindicat pentru imunizarea de rutină	50%	Frecvent febră, durere locală, tumefacție
Meningococi A, C, Y, W 135	1981	4 serotipuri de polizaharide bacteriene	Subcutanat	Militari, călători în zone epidemice	90% la vârsta de 2-3 ani	Rare
Ciumă	1911	Bacterii inactivate	Intramuscular	Personal de laborator, agenți silvici în zone endemice, călători	90% răspuns la anticorpi dar eficiență nesigură 100%	10% reacții locale; rar abcese și hipersensibilitate;
Rabie	1980	Virusuri inactivate	Intramuscular sau intradermic	Călători, veterinari, personal de laborator	100%	25% reacții locale; 6% artropatie, artrită
Febră galbenă	1953	Virusuri vii	Subcutanat	Personal de laborator, călători	Inaltă	Encefalită
Encefalopatie japoneză	1993	Virusuri inactivate	Subcutanat	Călători	80-90%	Frecvent reacție alergică întârziată severă după 10 zile
Febră tifoidă				Nu se recomandă administrarea		
Ty21a omorât cu fenol la cald	1952	Bacterii omorâte întregi	Intramuscular	Călători, contacți cu purtători	50-70%	Frecvent febră, tumefacție locală, durere
		Bacterii mutante vii	Oral	Călători, contacți cu purtători	50-70%	Absente

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 16.3 Programul de vaccinări recomandat pentru copii de General Recomandations on Immunization, 1989

Vaccinul	Vârsta					
	2 luni	4 luni	6 luni	12 luni	15 luni	4-6 ani (înainte de şcolarizare)
DTP	V	V	V		V*	V
Polio	V	V			V*	V
ROR					V**	V***
Hib						
Opţiunea 1	V	V	V		V	
Opţiunea 2	V	V		V		
La naştere	1-2 luni		6-18 luni			
HVB						
Opţiunea 1 V	V****		V****			
Opţiunea 2	V****	V****	V****			

Notă:

DTP – vaccin combinat pentru difterie, tetanos şi pertussis;

Polio- picături orale de polio viu (VPO) sau doze de vaccin polio omorât (inactivat)(VPI);

ROR – vaccinuri combinate pentru rujeolă, oreion, rubeolă; Hib – vaccin conjugat pentru *Haemophilus influenzae* tip b;

HVB – vaccin pentru hepatita virală B;

* - Experţii recomandă aceste vaccinuri la vârsta de 18 luni

**- In unele zone, vaccinurile ROR sunt administrate la 12 luni

***- Mulţi experţi recomandă administrarea vaccinurilor ROR la intrarea în gimnaziu sau în primele clase de liceu

****- Vaccinul anti-hepatită virală B se poate administra simultan cu DTP, polio, ROR şi vaccinul conjugat Hib.

Utilizarea vaccinurilor în cazul persoanelor HIV infectate nu indică un risc crescut al efectelor adverse după administrarea de vaccinuri vii sau atenuate. Răspunsul imun la persoanele imunocompromise nu poate fi la fel de puternic ca în cazul sistemului imun normal. Cu excepţia vaccinului antipolio, persoanele cu infecţie HIV trebuie imunizate cu vaccinurile recomandate cât mai devreme în cursul bolii.

Administrarea simultană a vaccinurilor vii şi inactivate nu afectează răspunsul imun sau creşterea ratei reacţiilor adverse. Acest mod de administrare urmăreşte probabilitatea ca un copil să fie complet imunizat în eventualitatea unor călătorii în ţări endemice, unde există riscul expunerii la numeroase boli infecţioase.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vaccinarea poliomielitică

Poliomielita este o enteroneurovirozã care este pe punctul de a fi eradicată ca urmare a programenlor de vaccinare preventivă şi de supraveghere epidemiologică. După ce în 1949, Enders J.F., Robin F.C. şi Weller T.H. reuşesc să cultive virusul pe culturi de celule de rinichi de maimuţă, în 1955, Johanes D. Salk obţine vaccinul cu virus polionmielitic omorât, iar în 1956, Albert Sabin pe cel cu virus poliomielitic atenuat.

Poliovirusul are trei tipuri distincte imunologic (I, II, III). Prima fază a bolii se manifestă ca o infecţie acută gastrointestinală, când virusul este prezent în gât şi fecale; în faza a doua virusul trece în sânge de unde, în faza a treia migrează în meninge.

În peste 90% din cazuri infecţia evoluează inaparent, paralizia poliomielitică afectând 0,1 – 2% din bonavi. Se caracterizează prin distrugerea celulelor nervoase cerebrale care duce le diferite grade de paralizie. Infecţia se transmite oro-fecal şi adulţii nevaccinaţi prezintă riscuri mai mari decât copiii de a face forma paralitică a infecţiei.

Introducerea vaccinului cu virus viu atenuat (Sabin) în 1962, a dus la scăderea remarcabilă a cazurilor de poliomielită. Vaccinul inactivat polio (VIP) conţine cele 3 tipuri de polivirus inactivat cu formalină. Prin injectare stimulează producerea de anticorpi de clasa IgM şi IgG care neutralizează virusul în faza a doua a infecţiei.

Vaccinul polio viu oral (VPO) este utilizat pe scară largă, datorită costului redus, a administrării uşoare; conţine trei tipuri atenuate de polivirus şi este administrat sub formă lichidă, pe limbă. Vaccinul infectează mucoasa orofaringiană şi gastrointestinală, declanşând răspunsul imun comun şi producerea de anticorpi secretori şi umorali. IgA, secretate de epiteliul intestinal, asigură rezistenţa locală în prima fază a infecţiei poliomielitice. Infecţia celulelor epiteliale, frecvent cu un enterovirus, inhibă simultan infecţia cu tulpina respectivă. Dozele trebuie administrate la interval de o lună pentru a permite ca infecţia anterioară să înceteze. Vaccinarea suplimentară este totuşi efectuată pentru a acoperi eventualitatea că o infecţie cu enterovirus, prezentă în timpul vaccinării, ar reduce răspunsul la tulpina din vaccin.

Eliminarea fecală a virusului din vaccin continuă încă 6 săptămâni şi se răspândeşte prin contact, realizând o reimunizare.

Probabilitatea ca vaccinul asociat poliomielitic să revină, de la forma atenuată, la forma virulentă (mai ales tipurile II şi III) este 1:4 000 000 doze.

În ţările dezvoltate riscul infecţiei naturale cu virusul poliomielitei este foarte redus, riscul cel mai mare fiind reprezentat de vaccinul cu tulpine vii. Ca urmare în America s-a propus înlocuirea vaccinului atenuat cu vaccinul polio inactivat.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vaccinarea pentru rujeolă, oreion şi rubeolă

Produse de paramyxovirusuri, rujeola, oreionul şi rubeola sunt boli infecţioase care se transmit pe cale respiratorie. Fiecare virus are un singur serotip; când multiplicarea primară are loc la nivelul tractusului respirator, boala este asociată cu multiplicări ale virusului şi în altă parte din organismul gazdei.

Rujeola

Este o infecţie acută, severă foarte contagioasă, epidemică. Virusul se multiplică în tractusul respirator de unde ajunge în organism, mai ales la nivelul tegumentului unde apare un rash maculopapular caracteristic. Boala poate da complicaţii , mai ales la copii malnutriţi, cu afectări neorologice şi moarte.

În 1962 în SUA a fost introdus vaccinul atenuat rujeolic; o doză mică asigură o imunitate ridicată în peste 95% din cazuri. Deşi vaccinul induce imunitatea mai rapid decât infecţia naturală, trebuie totuşi controlate izbucnirile de rujeolă.

Virusul rujeolei poate supravieţui şi în afara gazdei infectate. Extinderea utilizării vaccinului poate potenţial, elimina infecţia pe plan mondial.

Imunizarea de masă a dus la reducerea incidenţei rujeolei, deşi în SUA, frecvenţa infecţiei a crescut de 15 ori între 1989 – 1991, datorită slabei cooperări cu populaţia.

Oreionul

Infectarea glandelor parotide cu virusul oreionului duce la umflarea acestora şi la răspândirea generală a agentului patogen. Complicaţiile care apar – pancreatite, meningite, orhite pot duce ocazional la sterilitate masculină. La orice vârstă boala poate cauza surditate unilaterală permanentă. Peste 90% din indivizii nevaccinaţi pot contacta infecţia. Programul de vaccinare cu virusul viu atenuat a fost iniţiat din 1967.

Rubeola

Rubeola este adesea o infecţie subclinică, frecventă la copiii cu vârsta de 4 - 9 ani. Infecţia apărută în primul trimestru de sarcină este asociată cu risc de avort sau malformaţii congenitale ale fătului (Sindromul rubeolei congenitale).

Sunt imunizate cu vaccin viu atenuat fetiţele până la pubertate şi femeile neimunizate. Dezavantajul major al vaccinului este că produce infectarea fătului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De aceea se impune ca vaccinarea să fie făcută cu cel puțin o lună înaintea programării unei sarcini. Vaccinul rubeolei se administrează, la ambele sexe, la vârsta de 15 luni.

Vaccinul viu atenuat pentru rujeolă, oreion şi rubeolă a fost introdus din 1988, în Anglia, pentru copiii de ambele sexe. Este un preparat liofilizat, din tulpinile atenuate ale virusurilor rujeolei, oreionului şi rubeolei şi asigură protecție de peste 95%.

Pentru protecția maximă, vaccinul este administrat la vârsta de 12 – 15 luni dar pot fi vaccinați şi adulții neimunizați. Din 1996 a fost recomandată şi o a doua doză de vaccin pentru copii cu vârsta de 4 ani pentru a preveni eventuale epidemii.

Vaccinul tuberculozei

Tuberculoza este o cazuă a morbidității şi deceselor mai ales în condițiile malnutriției şi mizeriei. Infecția umană este dobândită prin contaminarea aerogenă cu *Mycobacterium tuberculosis* şi *M. bovis*. Boala se localizează mai ales în plămân, cauzând infecții cronice ale tractusului respirator inferior dar are şi alte localizări sau se poate generaliza (tuberculoza miliară).

Vaccinul viu atenuat este necesar pentru protecția împotriva tuberculozei; atât anticorpii cât şi imunitatea mediată celular intervin în obținerea imunității protectoare. Vaccinarea cu BCG (Bacilul Calmette – Guerin) obținut dintr-o tulpină atenuată de *M. bovis* este utilizat curent în țările unde tuberculoza este endemică. Vaccinul este administrat copiilor cu vârsta de 13 – 14 ani şi adulților neprotejați, cu o eficiență de aproximativ 70%.

Vaccinul poate da reacții adverse la persoanele care deja au fost expuse la infecție şi de aceea trebuie făcut un test de sensibilitate înaintea imunizării cu BCG. Testul Mantoux verifică sensibilitatea individuală față de tuberculină (derivat proteic purificat, obținut *din M. tuberculosis*).

Testul pozitiv indică o infecție anterioară sau o imunizare eficientă realizată anterior. Totuşi numeroase persoane cu tuberculoză diseminată pot avea testul la tuberculină negativ şi ca urmare, rezultatele testului trebuie interpretate cu atenție.

Vaccinul şi-a dovedit eficiența în prevenirea tuberculozei la copii, dar are efecte profilactice scăzute asupra persoanelor care au avut deja o infecție cu bacilul tuberculozei. O soluție ar fi imunizarea nou născuților, la vârsta de 2 – 4 săptămâni.

Vaccinul difteric

Difteria este o infecție acută, non-invazivă, localizată la nivelul tractusului respirator superior. Perioada de incubație este de 2 – 5 zile, boala durează aproximativ 4 săptămâni. Toxina

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

produsă de *Corynebacterium diphteriae* difuzează pe cale sanguină spre principalele organe: rinichi şi suprarenale, ficat, sistem nervos, miocard, unde se fixează şi blochează sinteza proteinelor celulare. Decesul în rândul copiilor este de 3 – 5 %. Imunizarea difterică se realizează prin stimularea producerii de anticorpi antitoxici (antitoxine) în ser. Imunogenul este un toxoid, obţinut prin tratarea cu formaldehidă a toxinei purificate. În Anglia şi SUA vaccinarea profilactică antidifterică constă în administrarea subcutanată a 3 doze începând cu vârsta de 2 luni, separate între ele de un interval de cel puţin o lună. Toleranţa este foarte bună. În Franţa se efectuează 3 injecţii cutanate, la interval de o lună începând cu vârsta de 3 luni şi câte un rapel după 1 an, 5 ani şi 10 ani. În România, unde vaccinarea se practică din 1930, rapelurile se fac la vârstele de 1 an şi 3 ani.

Vaccinul tetanic

Tetanosul este o toxiinfecţie severă care survine în urma unei leziuni prin care pătrund în organism spori sau forme vegetative de *Clostridium tetani*. Bacteria rămâne localizată la locul de inoculare, unde se multiplică şi elaborează o toxină care acţionează la nivelul plăcilor motorii neuro-musculare. Primul semn al tetanosului este în mod obişnuit *trismusul*, contracţia dureroasă a muşchilor masticatori asociată cu anxietate. Contracţiile se generalizează, devin dureroase, permanente; moartea poate surveni prin asfixie acută în cursul unui spasm laringian. Boala nu conferă imunitate. Imunizarea se realizează prin vaccinarea cu antitoxină (toxoid) care stimulează producerea de anticorpi ce neutralizează toxina. Dacă toxina este produsă în cantităţi mici în urma infecţiei, vaccinul care acţionează rapid, poate fi utilizat şi profilactic. Toxoidul se obţine prin reacţia toxinei cu formaldehida şi absorbţia pe un abjuvant. Profilaxia primară a tetanosului constă în 3 doze, administrate în interval de o lună, începând cu vârsta de 3 luni.

Vaccinul tusei convulsive (Pertussis)

Tusea convulsivă este o infecţie acută a căilor respiratorii produsă de *Bordetella pertussis*, patogen non-invaziv respirator, care se poate complica cu bronho-pneumonie, vomă după accesele de tuse, scăderea în greutate, hipoxie cerebrală cu riscul afectării creierului. Din 1970, mortalitatea prin tuse convulsivă a scăzut la 1:1 000 cazuri, procentul fiind mai mare la copiii cu vârsta sub 1 an.

Cursa completă a vaccinării (suspensia omorâtă de *B. pertussis*) asigură protecţie de peste 80%.

Profilaxia primară constă în 3 doze, spaţiate la interval de o lună, începând cu vârsta de 3 luni.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vaccinul combinat difteric – tetanic – pertussis (DTP)

Cursa primară a protecției DTP începe la vârsta de 3 luni prin administrarea a 3 doze, la interval de o lună. Componenta *pertussis* a vaccinului acționează ca un adjuvant adițional pentru componentele toxoide.

Dacă vaccinul *pertussis* este contraindicat sau refuzat se continuă cu vaccinul combinat difteric-tetanos deoarece riscul tetanosului și al infecției difterice persistă toată viața. Vaccinul DT trebuie repetat la vârsta de 4 – 5 ani și din nou la pubertate.

Cursa primară de vaccinare pertussis asigură o protecție solidă și durabilă și este suficientă, mai ales că mortalitatea prin tuse convulsivă a scăzut foarte mult după perioada copilăriei.

Imunizarea față de *Haemophilus influenzae* Tip B

Infecțiile respiratorii la copii sunt cauzate de șapte serotipuri capsulare *de Haemophilus influenzae Tip B.*

Tipul B este răspunzător de meningite asociate frecvent cu bacteriemii. Infecția este mortală în 4 – 5% din cazuri; 8 – 11% dintre supraviețuitori rămân cu afectări neurologice. Boala are cea mai mare frecvență la vârsta de aproximativ 1 an; după 4 ani, infecțiile cauzate de *H. influenzae* sunt mai rare. Ca frecvență la copii, meningitele cu *H. influenzae* ocupă locul secund după meningitele meningococice.

La adult, *H. influenzae* este unul din agenții principali ai puseelor purulente de bronșite acute și cronice.

După dispariția anticorpilor materni, spre vârsta de 3 luni, receptivitatea copilului este maximă până la aproximativ 3 ani când se instalează imunitatea naturală dobândită. Vaccinul se prepară din polizaharidele capsulare purificate ale tipurilor capsulare principale. Polizaharidele sunt slab imunogene dar sunt conjugate cu o proteină purtător (Carrier) cu rol în creșterea eficienței.

Antigenele purificate combinate cu toxoidele difterică și tetanică și proteina din membrana externă a meningococilor de grup B, sunt utilizate ca vaccin.

Vaccinul se administrează, în prima cursă, începând cu vârsta de 2 luni, în 3 doze la interval de o lună. După 4 ani riscul infecției este neglijabil și rapelul nu mai este necesar.

Vaccinul stafilococic

Suspensia diferitelor tulpini de stafilococ, omorâtă prin căldură este utilizată în terapia unor infecții stafilococice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tot pentru tratarea infecţiilor stafilococice se utilizează şi *anatoxina stafilococică*, purificată şi concentrată, produsă de Institutul Cantacuzino, Bucureşti.

Vaccinul polimicrobian

Este obţinut prin amestecul proporţional a culturilor inactivate de streptococ, stafilococ şi bacil piocianic şi utilizat în terapia unor procese supurative.

Vaccinul gonococic

Este produs de Institutul Cantacuzino, Bucureşti, din suspensia omorâtă prin căldură de *Neisseria gonorrhoeae* şi aplicat în terapia infecţiilor gonococice cronice.

Seruri imune

Până la descoperirea chimioterapicelor şi antibioticelor serurile imune au constituit o medicaţie eficientă pentru tratarea multor boli infecţioase.

Serurile imune conţin anticorpi specifici, rezultaţi prin vaccinare, sau după trecerea prin boala naturală şi pot fi utilizate în scop terapeutic sau profilactic. Imunitatea obţinută prin introducerea în organism, cu aceste seruri de anticorpi gata formati este pasivă. Protecţia asigurată este de scurtă durată (10 – 30 zile).

După proveniență, serurile imune sunt omologe şi heterologe.

Serurile omologe se obţin de la om, fie de la convalescenţi după boli infecţioase fie de la indivizi imunizaţi activ. Serurile omologe sunt utilizate astăzi sub formă de *imunoglobuline specifice* obţinute din alte seruri.

Serurile heterologe se obţin de la animale (cal, iepure, oaie) imunizate activ cu diferite vaccinuri. Prin purificare şi concentrare se reduce riscul stărilor de sensibilizare.

După anticorpii pe care îi conţin şi modul de acţiune, serurile heterologe se împart în seruri antitoxice, antimicrobiene, mixte, antivirale.

1. Seruri antitoxice: antidifteric, antitetanic, antibotulinic, antigangrenos, antiperfringens, antistafilococic, antiviperin.
2. Seruri antimicrobiene: antimeningococic polivalent, antipiocianic polivalent utilizat în infecţiile severe cu *Pseudomonas aeruginosa*)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Seruri mixte cu acțiune antimicrobiană şi antitoxică: antidizenteric polivalent care nu mai este utilizat, deoarece posibilitatea terapiei cu agenți antimicrobieni este extinsă.
4. Seruri antivirale: serul antirabic a fost produs prima dată de V. Babeş şi este utilizat şi astăzi în profilaxia rabiei. Se obține prin hiperimunizarea cailor cu tulpina de virus Babeş cultivată pe celule de creier de iepure.

Serurile imune se utilizează în scop terapeutic în difterie, tetanos, botulism, muşcături de şerpi veninoşi şi în scop profilactic: muşcături de animale, plăgi tetanigene (Tabel 16.4).

Administrarea serurilor pe cale intravenoasă realizează efecte imediate de neutralizare a toxinelor prezente în sânge.

Tabel 16.4 Seruri imune utilizate în România

Denumirea	Activitatea (UI/fiolă)
A. Seruri livrate curent	
- Ser antidifteric purificat şi concentrat	20 000
- Ser antitetanic purificat şi concentrat	
- Ser antigangrenos polivalent purificat şi concentrat	conținut/fiolă
	anti-perfringens 10 000
	anti-oedematiens 10 000
	anti-septicum 6 000
	anti-histolyticum 4 000
- Ser antirabic purificat şi concentrat	500
	1 500
- Ser antibotulinic mixt A + B	conținut/flacon
	anti-A 2 500
	anti-B 250
- Ser antiviperin	Pentru muşcături de vipere din Europa
B. Seruri livrate la comenzi speciale	
- Ser antiperfringens purificat şi concentrat	10 000
- Ser antipiocianic purificat şi concentrat	1 500
- Ser antistafolococic purificat şi concentrat	fiole cu 3 000 UI
- Ser antidizenteric polivalent	fiole cu 4 000 UI
- Ser anticărbunos	fiole cu 20 ml

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Imunoglobulinele (gamma-globulinele)

Imunoglobulinele normale se obțin prin electroforeză din amestecuri de plasmă obținută de la sute de donatori. Fracțiunea gamma a globulinelor reprezintă partea purtătoare de anticorpi a proteinelor serice. Imunoglobulinele umane normale conțin, în formele comercializate predominant fracțiunea IgG (Tabel 16.5).

Tabel 16.5 Preparate disponibile pentru imunitatea pasivă (după Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration)

Produsul imunologic	Indicații
Globulina imună umană standard	
Imunoglobuline intravenoase (IGIV)	Terapia de înlocuire pentru bolile cu deficit de anticorpi, purpura trombocitopenică imună; hipogamma-globulinemia din leucemia limfocitară cronică; boala Kawasaki.
Imunoglobuline intramusculare (IGIM)	Imunodeficit de anticorpi; profilaxia hepatitei A pre- şi post-expunere; profilaxia hepatitei B; a hepatitei non-A non-B; profilaxia post-expunere a rujeolei şi varicelei
Globuline serice imune umane speciale	
Imunoglobulina anti-hepatită B (IGHB)	Nou născuți expuşi perinatal; profilaxia post-expunere a hepatitei B
Imunoglobulina anti-varicela-zoster (IGVZ)	Profilaxia post-expunere la persoane imunocompromise susceptibile, femei însărcinate susceptibile, nou născuți expuşi perinatal
Imunoglobulina antirabie (IGR)	Tratamentul post-expunere al rabiei la pesoanele care nu au fost imunizate anterior
Imunoglobulina antitetanică (IGT)	Tratamentul tetanosului, profilaxia post-expunere la persoane neimunizate adecvat cu anatoxină tetanică
Imunoglobulina intravenoasă anti-citomegalovirus (VCM-IGIV)	Profilaxia persoanelor cu transplant de măduvă osoasă şi rinichi
Imunoglobulina anti Rho (D)	Prevenirea bolii hemolitice prin Rh a nou-născutului
Globuline şi seruri de animale	
Antitoxina difterică (de cal)	Prevenirea sau tratamentul difteriei
Antitoxina botulinică (de cal)	Tratamentul botulismului

În prezent gamma – globulinele au înlocuit aproape total serurile imune. Terapia cu imunoglobuline prezintă o serie de avantaje; conțin o cantitate mare de anticorpi, au spectru larg de acțiune (antivirală, antibacteriană, antitoxică), nu prezintă riscul transmiterii unor virusuri.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

Standards for pediatric immunization practices, Morb Mort Week Rep 42 (RR-5):1, 1993.

American College of Physicians. *Guide for Adult Immunization* 2nd ed. Philadelphia, American College of Physicians, 1990.

Ivan A, Azoicăi D. *Vaccinologie*. Ed. Polirom Iaşi, 81-112, 1995.

Ajjan N. *La vaccination*. Ed Inst Merieux, Lyon, France, 6-222, 1985.

Coursaget P. *Prevention des hepatitis virales par vaccination specifique*. Med Mal Infect, 11:578-585, 1989.

Ray WA, Griffin MR. *Confounding in studies of adverse reaction to vaccines*. Amer J Epidem, 139, 2: 229-231, 1994.

Serban O, Toascen E. *Schema de vaccinare antirabică*. In: Actualizări în turbare. Ed Ceres Bucureşti, 96-128, 1984.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA A –III-A

PARAZITOLOGIE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17

Noțiuni de parazitologie medicală

Parazitologia medicală este o ramură a microbiologiei care studiază animalele nevertebrate, încadrate în regnul Animalia, capabile să producă infecții la om şi animale. Sunt grupate în două subregnuri; *Protozoa*, organisme unicelulare în care toate funcțiile vitale sunt asigurate de o singură celulă şi *Metazoa*, organisme multicelulare la care funcțiile vitale sunt asigurate de structuri celulare organizate ca țesuturi şi organe.

Infecțiile parazitare se referă la cele cauzate de protozoare şi helminți. Termenul de parazit derivă din grecescul "*parasitos*": "cel ce mănâncă la masa altuia". Paraziții au cicluri biologice complexe şi determină infecții cronice de durată la gazda umană. Ciclul vital tipic al unui parazit cuprinde stadii secvențiale de dezvoltare, în interiorul mai multor gazde şi în unele cazuri o perioadă de existență liberă. Gazdele non-umane implicate în diversele cicluri vitale ale parazitului sunt reprezentate de insecte, moluşte, mamifere iar transmiterea prin intermediul acestor vectori biologici sau gazde intermediare infectate, reprezintă o caracteristică esențială a numeroase infecții parazitare.

Subregnul *Metazoa*, include două grupuri cu importanță medicală: helminți şi artropode.

Cei mai mulți din paraziții implicați în infecțiile umane sunt transmişi prin consum de apă şi hrană contaminate (Tabel 17.1).

Infecții determinate de protozoare

Amebiaza şi infecțiile cu amibe libere

Amebiaza este produsă de protozoarul intestinal *Emtamoeba histolityca*; 90% din infecții sunt asimptomatice iar restul prezintă semne de simptome clinice de la dizenterie până la abcese hepatice.

Patogenitate. Infecția este dobândită prin ingestia de chisturi viabile prezente în apă, alimente, mâini murdare. Trofozoiții sunt eliberați din chisturi în intestinul subțire, unde invadează mucoasa intestinului subțire producând necroză locală. Dacă trec în torentul sanguin, produc abcese hepatice, pulmonare sau cerebrale la distanță.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 17.1 Paraziți cu importanța medicală transmisibili prin apă, hrană, insecte

Parazit	Transmitere	Boala/infecția
Protozoare intestinale		
Entamoeba histolityca	Apă, fructe, legume, contaminate cu chisturi proveniți din fecale umane	Amebiaza
Giardia lamblia	Apă, fructe, legume contaminate; sursa - fecale umane	Lambliaza
Isospora belli	Hrană şi apă contaminate cu fecale umane	Diaree, iritații intestinale
Balantidium coli	Hrană şi apă contaminate mai ales cu fecale porcine	Diaree, ulcerații intestinale
Cryptosporidium species	Hrană, apă; contaminare directă interumană; animale din fermă (oi, viței)	Criptosporidioza, scaune apoase şi pierdere cronică de fluide când parazitul invadează suprafața epiteliului intestinal
Protozoare sanguine şi tisulare		
Plasmodium	Tințari	Malaria
Babesia microti	Căpuşe	Babesioza
Trypanosoma gambiense	Musca Tețe	Boala somnului africană
Leishmania donovani	Muşte de nisip (flebotomus)	Kala-azar
Toxoplasma gonidii	Pisica	Toxoplasmoza
Nematode		
Trichinella spiralis	Ingestie de carne contaminată	Trichioza
Enterobius vermicularis	Apă şi hrană contaminate cu ouă; transmitere interumană	Oxiuraza
Ascaris lumbricoides	Apă ş hrană contaminate cu ouă sau fecale umane	
Ancylostoma duodenale	Sol-piele	
Necator americanus	Sol-piele	Anemie feriprivă în infecții masive
Strongyloides stercoralis	Sol-piele	Strongiloidoza
Onchocerca volvulus	Muşte negre	Orbire de râu
Dracunculus medinensis	Consum de apă contaminată cu ciclopi care conțin larve	
Trichuris trichiura	Sol, fecal-oral	Ulceratii intestinale, anemie cronică
Trematode		
Trematode intestinale		
Fasciolopsis buski	Melci, castane de apă	Inflamații şi ulceratii intestinale, abcese, diaree
Trematode hepatice		
Fasciola hepatica	Melci, peşti	
Trematode pulmonare		
Specii de *Paragonimus*	Melci, crabi, raci	
Trematode sanguine		
Specii de *Schistosoma*	Melci	
Cestode		
Viermi lați intestinali		
Taenia saginata (vierme lat bovin)	Bovine	Iritații intestinale, obstrucții
Hymenolepis nana (vierme lat pitic)	Gândacul de cereale; consum de hrană şi apă în care sunt ouă; contaminare interumană	Iritații intestinale, diaree
Diphyllobothrium latum (vierme lat al peştelui)	Porcine; consum de peşte infestat	Obstrucții intestinale, diaree, dureri de abdomen, anemie
Taenia solium	Consum de carne de porc insuficient preparată termic contaminată; fecalele umane sunt sursa de ouă	Iritații intestinale, obstrucții
Echinococcus granulosus	Oi, cămile, om; consum de apă şi hrană contaminate cu fecale de animale domestice şi sălbatice	Hidatioza

BCU ASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capacitatea de a invada epiteliul intestinal a fost asociată cu factorii de virulență cum ar fi elaborarea de proteinaze extracelulare care degradează colagenul, elastina și componentele matricei extracelulare. Alte enzime desfac legăturile glicoproteice dintre celulele mucoase ale epiteliului la nivelul intestinului.

Amibele pot genera liza neutrofilelor, monocitelor, limfocitelor și a liniilor celulare hepatice. Infecția nu produce imunitate. Chisturile și trofozoiții sunt detectați în probele de fecale obținute de la pacienții infectați (Fig.17.1).

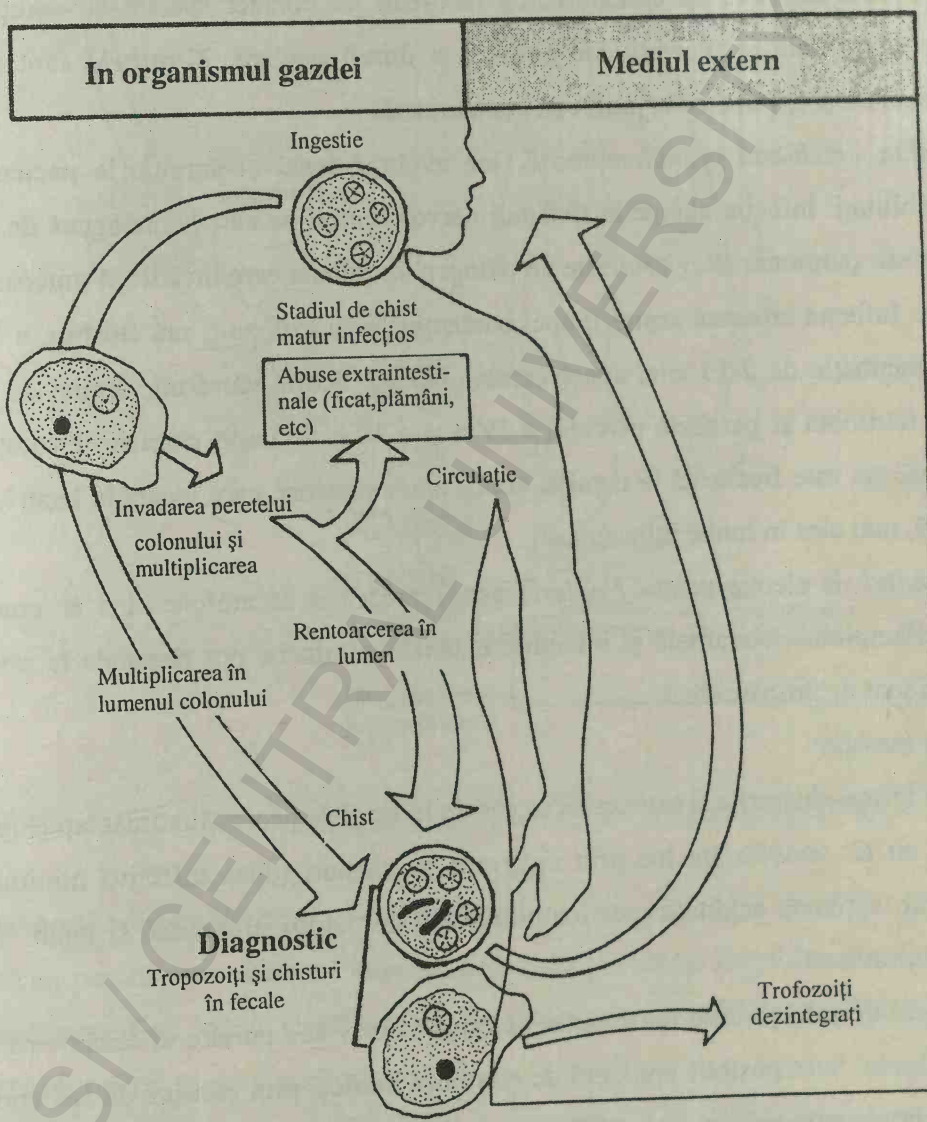


Fig.17.1 *Entamoeba hystolitica* – ciclul de viață (După Murray, 1990)

Epidemiologie. Amebiaza este endemică în țările tropicale, unde afectează 50% din populație. Aproximativ 10% din populația globului este infectată cu *E. histolytica*. După schistosomiază și malarie, amebiaza este a treia cauză de deces prin boli parazitare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Terapie. Amebecitele luminale sunt slab absorbite şi ating concentraţii mari în inestin, cu acţiune limitată, la trofozoiţii din apropierea mucoasei (iodochinol, paramomicina, diloxanid-furoat). Amebecitele tisulare ating concentraţii ridicate în sânge şi ţesuturi şi sunt active asupra ambelor forme de *E. histolytica* (metronidazol, tinidazol, ornidazol).

Amebele libere din genul *Acanthamoeba* şi *Nagleria* au răspândire largă (apă, sol, aer). La purtătorii sănătoşi sunt prezente la nivel intestinal şi nazal.

Inhalarea chisturilor, prezente în praf determină numeroase infecţii. Infecţiile oculare cu *Acanthamoeba* sunt asociate cu contaminarea lentilelor de contact spălate cu soluţii nesterile. Invazia parazitului produce ulceraţii ale corneei şi dureri oculare. *Keratitele* sunt asociate cu traumatisme oculare şi expunerea la praf, apă contaminată.

Encefalita amebiană granulomatoasă, are evoluţie lentă şi survine la pacienţii cu boli cronice sau debilitaţi. Infecţia ajunge la sistemul nervos central pe cale hematogenă de la un focar primar cutanat sau pulmonar. *Nagleria* este un patogen oportunist care invadează mucoasa nazală şi ajung în creier. Infecţia urmează aspirării apei contaminate cu trofozoiţi sau chisturi, a inhalării de praf. După o incubaţie de 2-15 zile, apare cefalee intensă, febră, vărsături, semne de meningită. Frecvent apar fotofobia şi paralizia perechii a IV-a şi a VI-a de nervi cranieni. Evoluţia poate fi rapid fatală. Infecţia este frecventă la copii şi adulţi tineri sănătoşi, care înoată în lacuri sau bazine cu apă incălzită, mai ales în lunile iulie august.

Tratamentul de elecţie pentru *Nagleria* este reprezentat de amfotericina B. combinată cu miconazol şi rifampicină. Keratitele şi infecţiile cutanate cu amebe pot răspunde la miconazol şi picături de izetionat de propamidină.

Giardia lamblia

Ambele forme-chisturile şi trofozoiţii se găsesc în fecalele pacienţilor infectaţi (Fig.17.2).

Infecţia cu *G. lamblia* are loc prin ingerarea de chisturi (doza infectivă minimă – 10-25 chisturi) care sub acţiunea acidităţii gastrice eliberează trofozioţii în duoden şi jejun. Trofozoiţii atacă mucoasa intestinală.

Rezervorul de infecţie este reprezentat de omul bolnav sau purtătorul sănătos care elimină chisturile prin fecale. Sunt posibile epidemii de giardioză hidrice, prin consum de apă contaminată. Transmisia de la o persoană la alta se face direct, prin mâini murdare sau indirect (obiecte contaminate) mai ales în colectivităţi cu nivel igienic scăzut.

Terapia se face cu quinacrin sau metronidazol. Una dintre măsurile de prevenţie este supravegherea sistemului de distribuţie a apei, deoarece chisturile sunt rezistente la concentraţiile standard de clor utilizate pentru dezinfecţia apei. Serviciile de sănătate publică trebuie să identifice rezervoarele de infecţie pentru a preveni răspândirea infecţiei.

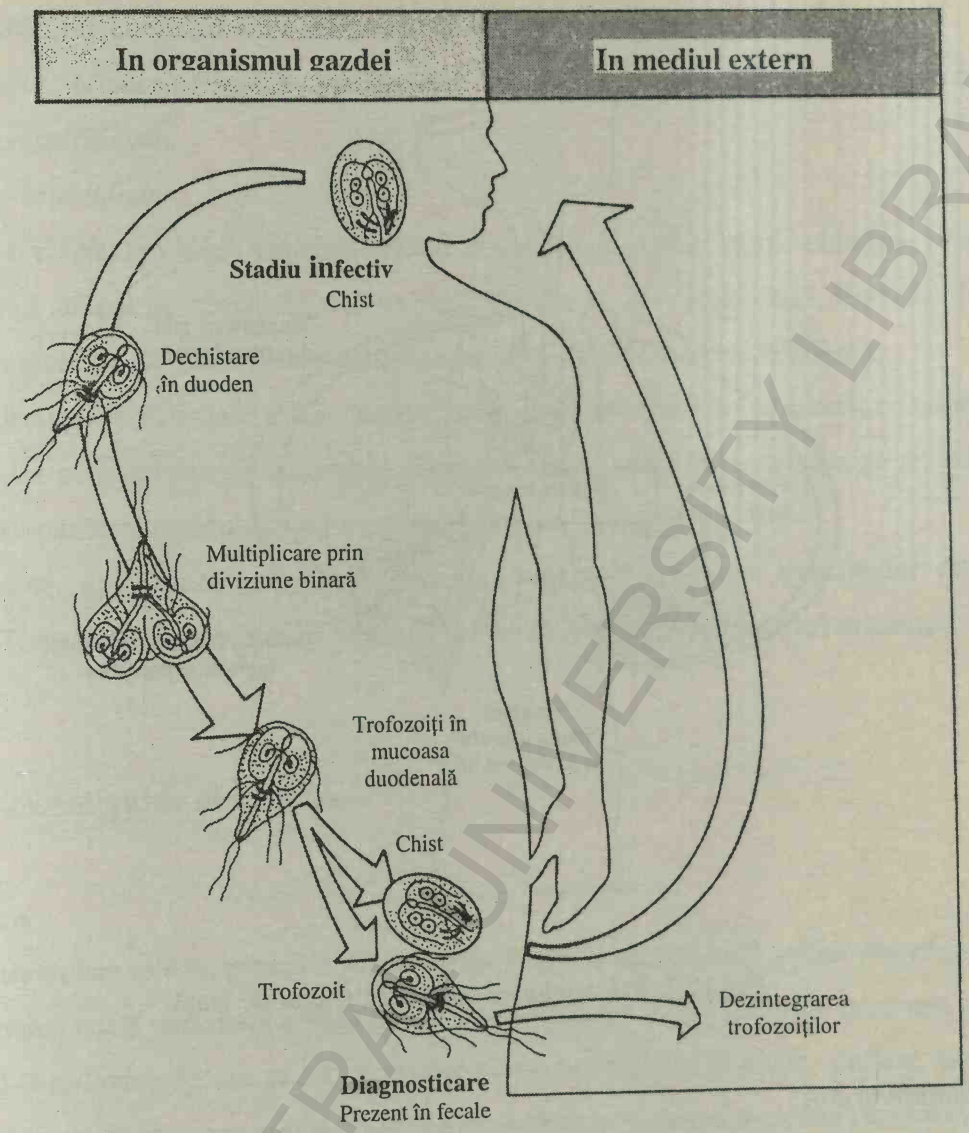


Fig.17.2 *Giardia lamblia*. Ciclul de viață (După Murray, 1990)

Trichomonas vaginalis

Este un parazit care cauzează infecții urogenitale. Prezența flagelilor și o scurtă membrană asigură mobilitatea. Este parazit strict în vagin sau uretra și prostata bărbaților. Există doar ca formă vegetativă (trofozoit) și nu formează chist.

Parazitul se transmite pe cale sexuală dar ocazional și prin obiecte de toaletă, apa din bazine, instrumentar (Fig.17.3). Nou-născuții pot fi contaminați la naștere.

La femei infecția este simptomatică și se manifestă prin secretii vaginale de culoare galbenă, urât mirositoare, eritem vulvar și prurit.

Tratament. Metronidazolul este medicamentul de bază; este important ca toți partenerii sexuali să fie tratați concomitent pentru prevenirea reinfecției.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

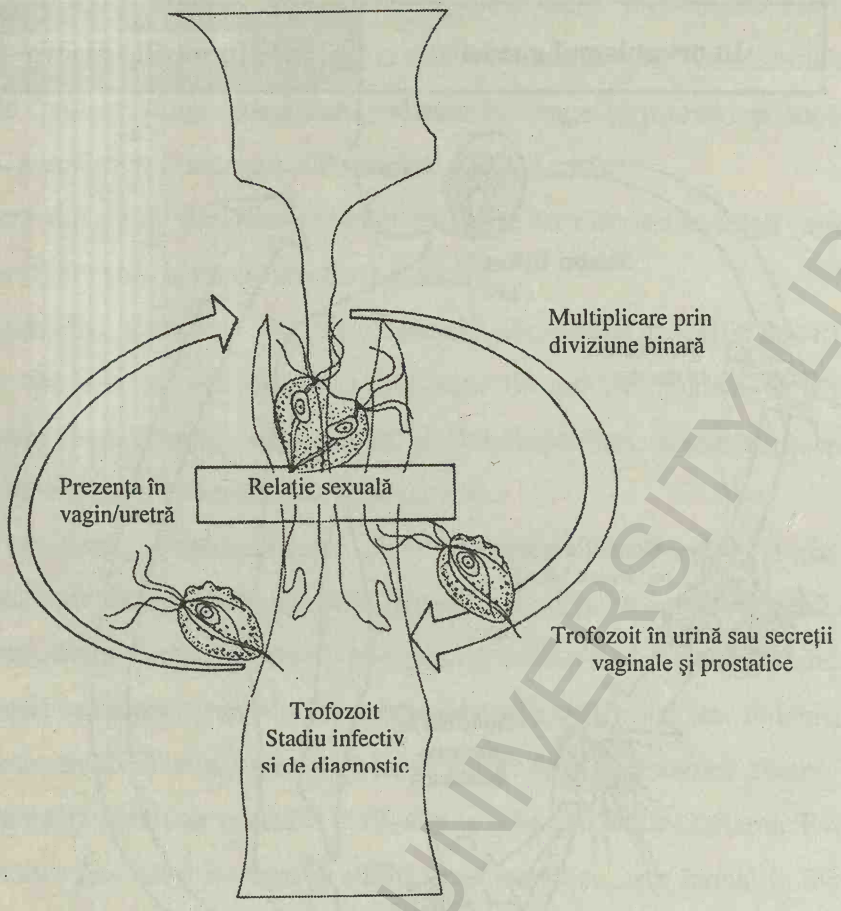


Fig.17.3 *Trichomonas vaginalis*. Ciclul de viață

Balantidium coli

Ciclul de viață este simplu: ingestia chisturilor, eliberarea acestora și invazia trofozoiților în mucoasa intestinului gros. Trofozoidul este acoperit cu cili care asigură mobilitatea.

B. coli are o largă răspândire. Rezervorul principal este porcul. Infecția se transmite pe cale orală. Izbucnirile epidemice sunt asociate cu contaminarea apei cu fecale porcine. Infecția se caracterizează prin dureri abdominale, tenesme, greață, anorexie, scaune apoase mucosanguinopurulente.

Tratament. Antibioticul de elecție este tetraciclina, iar ca alternative, metronidazol și iodoquinol.

Isospora belli

Este un parazit coccidian al epiteliului intestinal care produce izosporidiaza umană, boală mai frecventă în regiunile tropicale și subtropicale. Este frecventă la pacienții cu SIDA. Infecția apare în urma consumului de apă și alimente contaminate sau a contactului sexual oral-anal.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modificările la nivelul intestinului sunt asemănătoare cu cele din giardiază.

Terapie. Medicamentul de elecţie este trimetoprim-sulfametoxazol, în combinaţie cu pirimetacin şi sulfadiazin.

Cryptosporidium

Are o răspândire largă, cauzând infecţii la mamifere, reptile, peşti. Omul se contaminează din rezervorul animal iar răspândirea interumană se face pe cale fecal-orală. Personalul veterinar, cei care manipulează animale şi homosexualii sunt grupe cu risc crescut de infecţie.

La persoanele sănătoase, boala se manifestă ca o enterocolită autolimitată, cu scaune apoase, fără sânge. La pacienţii imunocompromişi sunt aproximativ 50 scaune apoase pe zi, evoluţia este cronică cu răspândirea parazitului în tot tractusul digestiv şi respirator.

Terapie. Spiramicina are acţiune asupra *Cryptosporidium* dar tratamentul este frecvent ineficient. Tratamentul este orientat în direcţia opririi pirderilor de apă la nivel intestinal.

Protozoare sanguine şi tisulare

Plasmodium

Plasmodium este un parazit coccidian transmis prin înţepătura ţînţarilor *Anopheles*. Este cea mai importantă boală parazitară pentru om, care afectează peste 2-3 miliarde persoane şi constituie cauza de 1-3 milioane decese anual. Acest protozoar necesită două gazde: ţînţarul, pentru stadiul reproducerii sexuate (sporogamia) şi omul pentru stadiul reproducerii asexuate (schizogonia).

Există patru specii ale genului *Plasmodium* care infectează omul*: P. falciparium, P. vivax, P. ovale* şi *P. malariae*. (Fig.17.4).

Infecţia umană este iniţiată prin înţepătura ţînţarului *Anopheles* care introduce în sânge sporozoiţii.

Sporozoiţii sunt transportaţi în parenchimul hepatic unde are loc reproducerea asexuată şi apar trofozoiţii. Aceasta este faza de merogonie intrahepatică sau exoeritrocitară, când un sporozoit va produce câteva sute de noi merozoiţi. Hepatocitul se rupe şi eliberează merozoiţii în circulaţia sanguină unde invadează rapid erotrocitele. Ataşarea este mediată de un receptor de suprafaţă specific eritrocitelor. In ciclul eritrocitar replicarea asexuată continuă trecând printr-o serie de stadii (merozoit, protozoar inelar (stadiu de inel), trofozoit, schizont imatur (prerozeta), schizont matur (rozeta)); unii merozoiţi se transformă în forme sexuate distincte gametociţi maculini şi feminini, în hematii şi în sângele circulant şi care nu se asociază cu boala.

BCU ASTI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

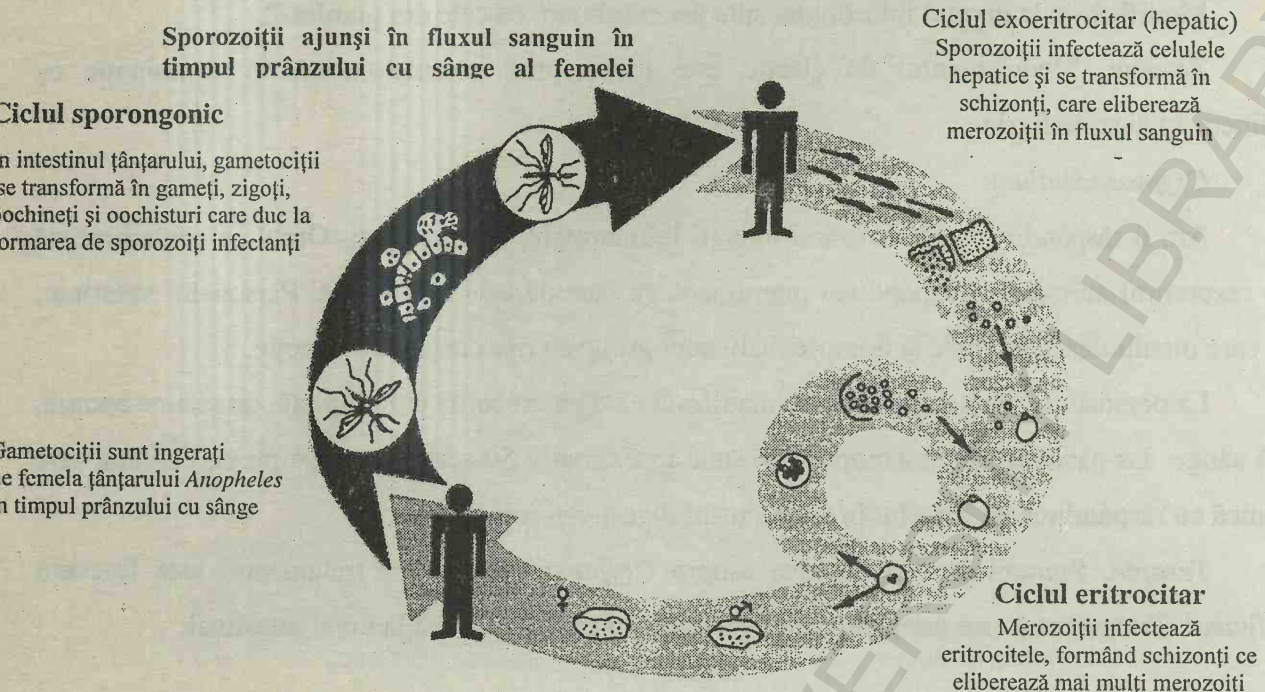


Fig.17.4 Ciclul de transmitere a malariei

După ingestia de sânge, prin muşcătura femelei ţînţarului anofel, gametociţii masculini şi feminini se unesc la nivelul intestinului insectei pentru a forma un zigot. Prin maturare acesta se transformă în oochinet care penetrează şi se închistează în peretele intestinului ţînţarului.

Oochistul formează, prin diviziune asexuată un număr foarte mare de sporozoiţi mobili, care se eliberează din acesta prin ruperea peretelui şi migrează în glanda salivară a ţînţarului de unde, prin înţepare sunt inoculaţi la om.

Epidemiologie. Malaria este prezentă în majoritatea regiunilor tropicale. *P. falciparum* predomină în Africa sub-sahariană, Guineea de Nord, Haiti. *P. vivax* este frecvent în America Centrală şi India iar *P. malariae* este întâlnit în majoritatea zonelor dar mai ales în Africa de Vest şi Centrală. Infecţia cu *P. ovale* este prezentă mai ales în Africa tropicală.

Contaminarea umană se produce preponderent prin înţepătura ţînţarului anofel, dar se mai poate face prin transfuzii cu sânge contaminat, prin accidente de laborator, congenital (foarte rar) sau prin administrare de narcotice cu ace şi seringi contaminate.

Patogenitatea. După ce infecţia progresează, ruperea hematiilor cu eliberare de merozoiţi duce la febră, anemie, hepatomegalie, splenomegalie. Resturile celulare toxice şi hemoglobina trec în circulaţi generală producând febră. Accesele febrile nealergice apar periodic când paraziţii ating numeric pragul piretogen.

BIBLIOTECA UNIVERSITARA LIBRARY

Răspunsul gazdei se manifestă la persoanele neimune, prin activarea mecanismelor de apărare nespecifice ale gazdei. In malarie imunitatea este instabilă: o persoană care a făcut infecția în timpul unei călătorii într-o zonă endemică dezvoltă imunitate care dispare după 1-2 ani. La revenirea în zonele endemice se comportă ca persoane neimune. Imunitatea de lungă durată presupune reinfecții şi o anumită densitate parazitară şi se dobândeşte doar în zonele endemice (imunitate concomitentă). Transferul pasiv al anticorpilor materni contribuie la protecția relativă a copilului mic față de malarie în cursul primelor luni de viață.

Caracteristici clinice generale. Simptomele inițiale sunt nespecifice, asemănătoare unor infecții virale minore, cu stare de rău, oboseală, cefalee, disconfort abdominal, dureri abdominale, febră, frisoane.

Malaria cerebrală este o complicație a bolii cauzate de *Plasmodium falciparum.* Coma este o caracteristică nefavorabilă de aproximativ 15 % la copii şi 20% la adulți.

Paludismul visceral evolutiv apare la pacienții fără imunitate concomitentă, expuşi unor infecții repetate, asociat cu anemie, astenie, splenomegalie accentuată, temperatură variabilă (37,5-38^{0}C). Anemia este produsă prin distrugerea accelerată şi îndepărtarea eritrocitelor de către splină şi prin supresia măduvei osoase prin eritropoieză ineficientă.

Terapia. Chimioterapia nu este pe deplin eficientă deoarece *P. falciparum* este rezistent la clorochină; meflochina este medicamentul de elecție pentru profilaxia persoanelor neimune care călătoresc în arii endemice. O alternativă este administrarea zilnică de doxicilină. Chinina (acțiune schizontocidă) este activă asupra tulpinilor rezistente la antipaludice.

Folosirea profilactică a combinației dintre pirimetamină şi sulfadoxină nu este recomandată din cauza toxicității, care determină dermatită exfoliativă, agranulocitoză, hepatită, eozinofilie pulmonară. O combinație în general bine tolerată este cea dintre pirimetamină şi dapsonă (deşi în doze crescute şi dapsona produce reacții alergice, agranulocitoza).

Medicația antimalarică trebuie administrată cu cel puțin o săptămână înaintea sosirii într-o regiune endemică, pentru a atinge niveluri sanguine terapeutice. Profilaxia trebuie să contribuie încă 4 săptămâni de la părăsirea regiunii.

Produsul chinezesc artemisinină este utilizat frecvent în Asia, cu eficiență asupra tulpinilor de *P. falciparum* multiplu rezistent la medicamente.

Babesia

Babesia este un protozoar intracelular, transmis prin căpuşe care morfologic seamănă cu *Plasmodium.*

Boala produsă, babesioza, este o zoonoză care afectează animalele; omul este gazdă accidentală. *Babesia microti şi B. divergens* sunt responsabile de infecțiile întâlnite la om.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Babesioza umană este rar întâlnită în Europa (Franța, Iugoslavia, Rusia, Scoția, Irlanda) dar mai frecventă în SUA.

Ciclul biologic. Căpușele (*Ixodes ricinus*) ingeră *Babesia* în timpul hrănirii iar paraziții se multiplică la nivelul peretelui intestinal al vectorului, după care ajung în glandele salivare ale acestuia.

Patogenitate. Căpușa inoculează sângele uman cu sporozoiții prezenți în glandele salivare. In hematiile infectate sporozoiții se transformă în trofozoiți care se multiplică asexuat, formând 2-4 merozoiți ce se eliberează din eritrocit prin perforarea membranei acestuia.

Manifestări clinice. După o perioadă de incubare de 1-4 săptămâni, debutul este caracterizat de manifestări clinice nespecifice: anorexie, cefalee, astenie, febră, artralgii, greață, vărsături, dureri abdominale, manifestări nervoase, urină brună, splenomegalie, uneori hepatomegalie.

Tratament și profilaxie. Antibioticul de elecție este clindamicina asociată cu chinina. In formele ușoare nu se recomandă terapie.

Utilizarea unor haine de protecție și insecticide poate reduce expunerea la înțepăturile de căpușe în zonele endemice. Căpușa trebuie să se hrănească mai multe ore, încât îndepărtarea promptă poate proteja organismul uman de infecție.

Toxoplasma gonidii

Toxoplasma gonidii, parazit obligatoriu intracelular, produce o parazitoză larg răspândită, toxoplasmoza. Parazitul este prezent la numeroase animale, inclusiv păsări și oameni.

Ciclul biologic prezintă două aspecte distincte: un ciclu felin și altul nonfelin. Forma asexuată de tahizoit, nonfelină, apare în gazde intermediare: om, rozătoare mici, ierbivore, omnivore. *T. gonidii* se poate dezvolta în orice celulă a mamiferelor, exceptând hematiile în care pătrund, dar nu se divid. Organismul se dezvoltă în celulele intestinale ale pisicii unde are loc un ciclu asexuat și unul sexuat. Prin multiplicarea trofozoiților rezultă chisturi care prin rupere eliberează bradizoiții ce pătrund în celulele intestinale unde se multiplică și se transformă în celule cu potențial sexual, care formează gameți masculini și feminini. Din fuziunea gameților rezultă un zigot (oochist care se acoperă cu un perete rigid și este excretat cu materiile fecale). După 3-4 zile de expunere la aer și temperatura mediului ambiant, oochisturile sporulează și produc 8 sporozoiți care infectează spiteliul intestinal al gazdei nonfeline, producând tahizoiți asexuați și în final bradizoiți. Tahizoiții se localizează în diferite organe, unde prin multiplicare, formează chisturi care persistă timp îndelungat (Fig.17.5).

Contaminarea umană se face prin: a). consum de carne preparată neadecvat provenită de la animale gazde intermediare; b). ingestia de oochisturi, în urma contactului cu pisica și cu obiecte contaminate de aceasta; c). consum de legume, fructe contaminate; d). contaminarea transplacentară a fătului.

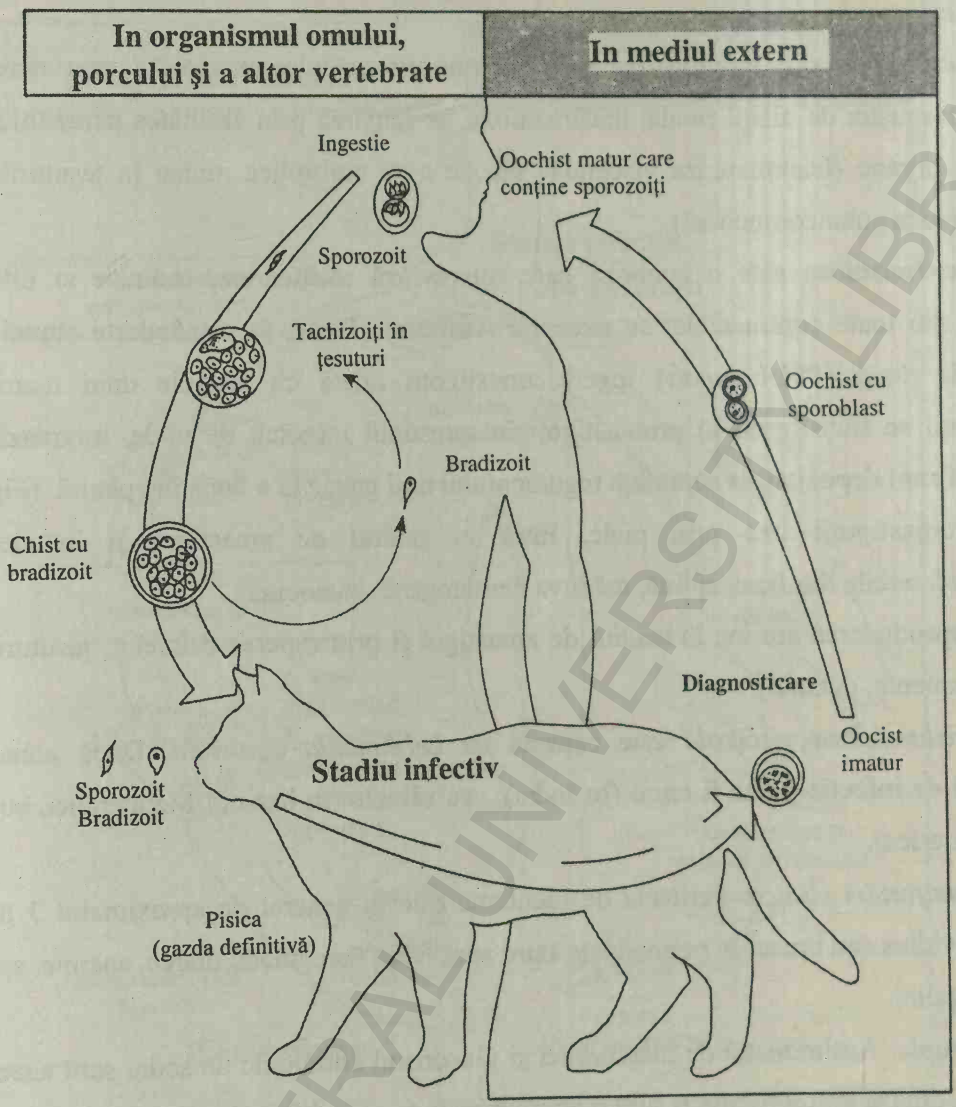


Fig.17.5 Toxoplasma gonidii. Ciclul de viaţă (După Murray, 1990)

Manifestări clinice. Infecţiile cu *T. gonidii* sunt benigne şi asimptomatice la persoanele cu sistem imun nemodificat. Toxoplasmoza manifestă clinic, evoluează cu astenie, stare febrilă adenopatii localizate cervical, occipital, trapezoidian. Vindecarea se face spontan, fără tratament.

Pacienţii cu SIDA şi cei care primesc terapie imunosupresivă prezintă risc crescut pentru toxoplasmoza acută. Toxoplasmoza este o infecţie oportunistă majoră a SNC la persoanele cu serologie pozitivă.

Terapia. Antibioticul de primă intenţie este pirimetamina şi ca alternative trisulfapirimidine sau spiramicin.

Trebuie evitat consumul de carne insuficient tratată termic; legumele şi fructele se consumă după spălare. Femeile gravide trebuie să respecte normele igienico-dietetice şi să evite contactul cu pisicile.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Leishmania

Leishmania este un protozoar flagelat, transmis gazdelor umane din rezervoare animale prin înțepătura muștei de nisip. Boala, leishmanioza, se remarcă prin abilitatea parazitului de a infecta diferitele organe (leishmanioza viscerală) sau de a se multiplica numai în țesuturile superficiale (leishmanioza cutaneomucoasă).

Leishmanioza este o zoonoză care interesează rozătoarele, caninele și diferite animale sălbatice din toate continentele, cu excepția Australiei. Boala se răspândește atunci când femela muștei de nisip (*Phlebotumus*) ingeră amastigoții odată cu sângele unui mamifer infectat. Amastigoții se transformă în promastigoți în intestinul insectei, de unde, migrează în glandele salivare și sunt depozitați la suprafața tegumentului noii gazde la o nouă înțepătură. (Fig.17.6).

Promastigoții trec prin piele, intră în stadiul de amastigot și invadează celulele reticuloendoteliale din ficat, splină, măduva hematogenă, leucocitele.

Reproducerea are loc în stadiul de amastigot și prin ruperea celulelor, țesuturile se distrug (hepatic, splenic, cutanat).

Leishmanioza viscerală este cauzată de *Leishmania donovani*. După zona geografică, rezervorul de infecție poate fi omul (în India), sau câinele (în bazinul Mediteranei, sudul Europei, China, America).

Manifestări clinice. Perioada de incubație este în general de aproximativ 3 luni. Debutul poate fi invidios sau brusc. In perioada de stare apar febra neregulată, diaree, anemie, spenomegalie, hepatomegalie.

Terapie. Antimonatul de meglumină și gluconatul antimonic de sodiu sunt agenți de elecție iar pentamidina și amfotericina B sunt o alternativă în terapia diferitelor tipuri de leishmanioză.

Leishmanioza cutanată (butonul de Orient, leishmanioza cutanată a lumii Vechi) este prezentă mai rar în Europa, dar frecventă în Orient. Rezervorul este reprezentat de om. Perioada de incubație este de 2-24 luni. Leziunea cutanată este nedureroasă, neinflamatorie, nepurulentă. Vindecarea survine în 1-2 ani și lasă o mică cicatrice depigmentată.

Leishmanioza cutaneomucoasă (leishmanioza Lumii Noi) este frecventă în bazinul Amazonului, dar și pe teritoriul ambelor Americi. Parazitul, *Leishmania brasiliensis* are ca rezrevor animalele sălbatice de la care paraziții trec accidental la om, prin înțepătura de flebotom. Leziunile cutanate, asemănătoare cu cele din butonul Orient sunt asociate de leziuni mucoase, ducând la distrugerea extinsă a structurilor tisulare moi, cu eroziuni mutilante dureroase. Febra, anemia, pierderea ponderală sunt frecvente. Decesul survine prin infecții bacteriene, inaniție, aspirație și obstrucție respiratorie.

Leziunile cutanate trebuie tratate cu antimonice, timp de 20 zile pentru a diminua riscul ulterior al formei cutaneomucoase.

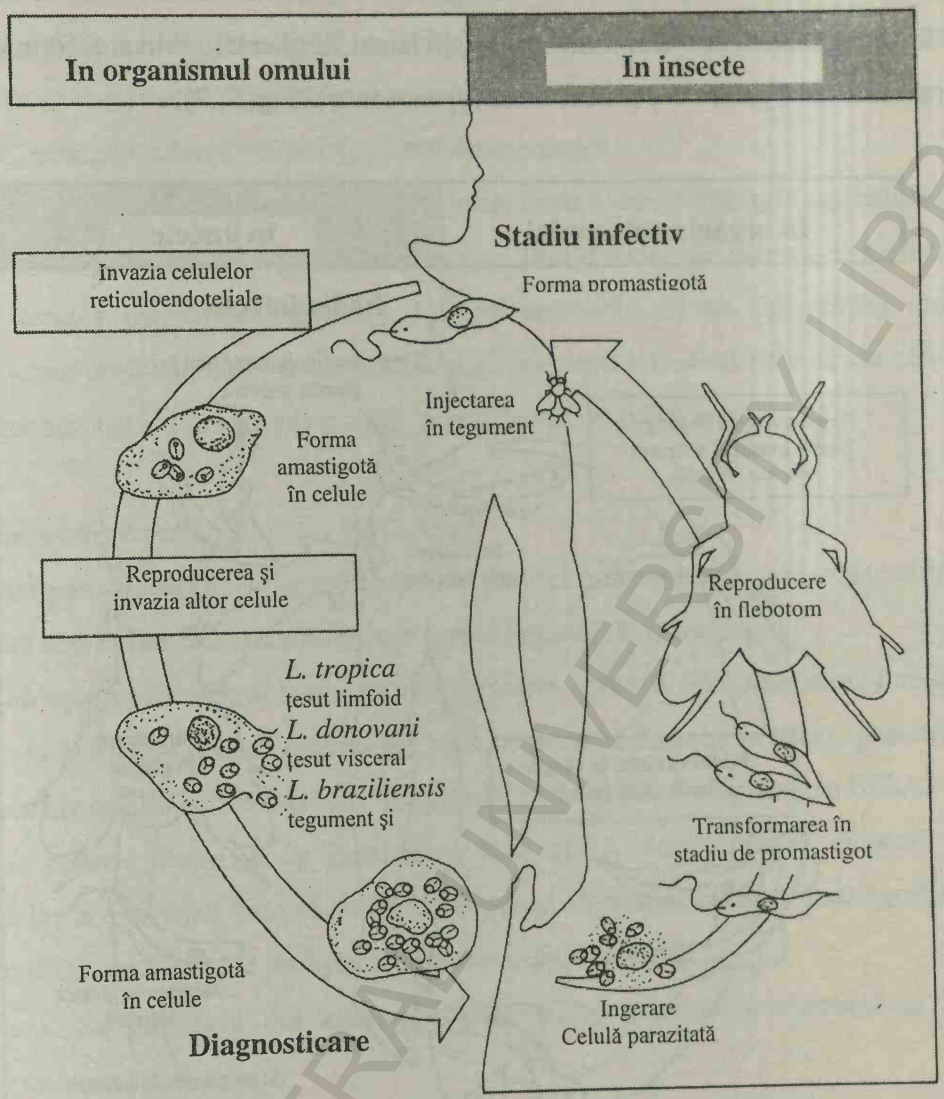


Fig.17.6 *Leishmania species*. Ciclul de viaţă (După Murray, 1990)

Trypanosoma brucei

Boala somnului (tripanosomiaza africană) este produsă de un protozoar flagelat *Trypanosoma brucei* cu două subspecii: *T. gambiense* şi *T. rhodesiense* transmise prin înţepătura muştelor ţeţe hematofage din genul *Glossina*. Insectele devin infectante prin ingestia sângelui de la gazdele mamifere infectate. După mai multe cicluri de multiplicare în intestinul insectei, paraziţii ajung în glandele salivare şi sunt inoculate la un nou prânz sanguin.

Stadiul infecţios este cel de *trypomastigot* prezent în glandele salivare ale insectei. In acest stadiu parazitul are un flagel şi o membrană ondulantă de-a lungul corpului şi pătrunde prin leziunea produsă de înţepătură în sânge şi limfă, eventual invadează sistemul nervos central. Reproducerea trypomastigoţilor în sânge, limfă, lichid cefalorahidian se face prin fisiune

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

longitudinală şi sunt infective pentru insecte. Migrează în glandele salivare unde se divide din nou, trecând în forma *epimastigotă*. După mai multe diviziuni în glandele salivare, forma epimastigotă trece în forma infectivă pentru om (forma metatrypanosoma) (Fig.17.7).

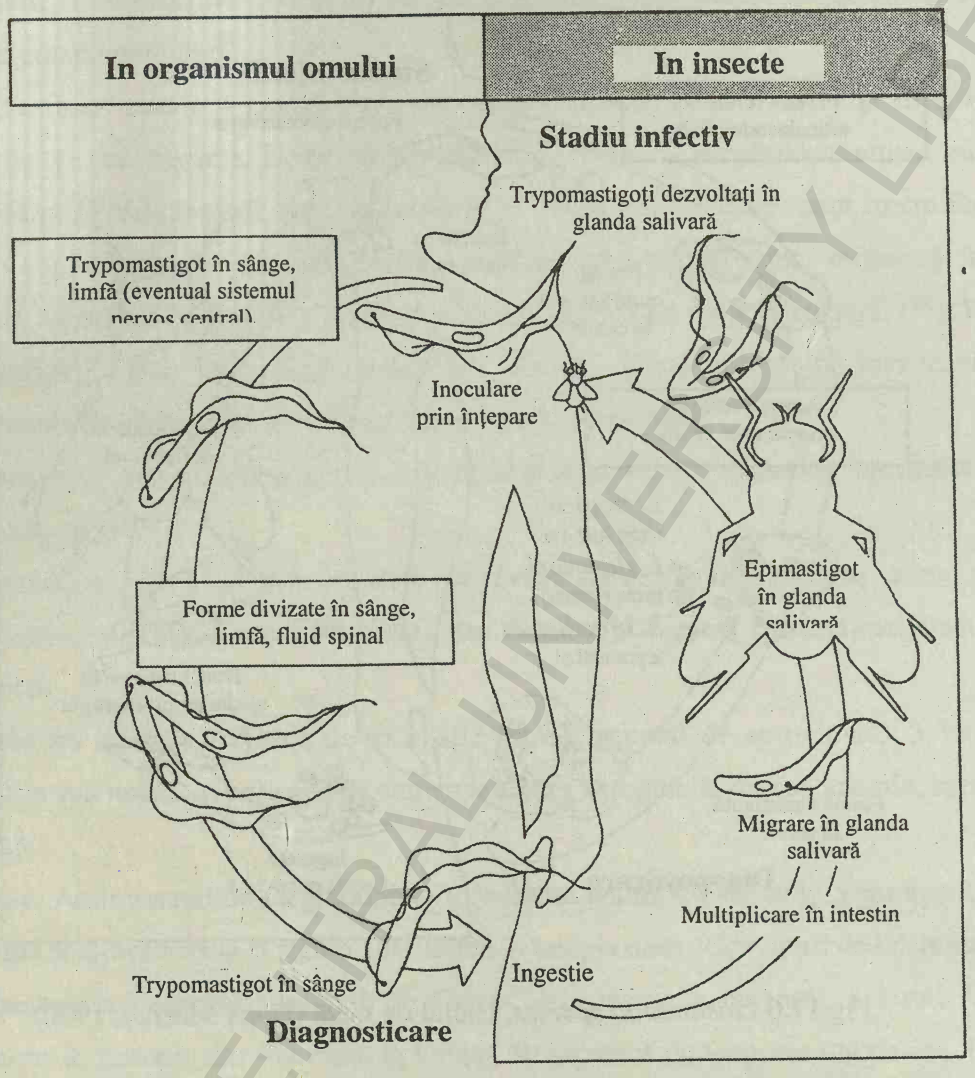


Fig.17.7 *Trypanosoma brucei.* Ciclul de viaţă (După Murray,1990)

Contaminarea umană se realizează prin înţepătura muştei ţe-ţe iar la locul de inoculare apare un nodul eritematos, înconjurat de o reacţie inflamatorie.

Diseminarea hematogenă şi limfatică (stadiul I al bolii) este marcată prin debutul febrei, cu puseuri febrile înalte pe durata mai multor zile,separate de perioade afebrile. Ca semne inconstante apar starea de rău, cefalee, artralgii , pierdere ponderală, edem, hepatosplenomegalie, tahicardie. Invazia SNC (stadiul II al bolii) este însoţită de manifestări neurologice şi modificări ale l.c.r.

Apare o indiferenţă progresivă şi o somnolenţă în timpul zilei, alternând uneori cu agitaţie şi insomnie în cusul nopţii, privirea este apatica iar vorbirea poate deveni întreruptă şi nedesluşită. Se instalează tulurări motorii şi în faza finală, afectarea neurologică progresivă duce la comă şi deces.

IOU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Terapie. In tratamentul tripanosomiazei africane se utilizează suramina, pentamidina şi compuşii organici de arseniu. Din 1990 se utilizează şi eflornitina (difluorometilornitina), pentru tripanosomiaza vest-africană. Tratamentul trebuie individualizat în funcţie de specia infectantă, afectarea SNC, reacţiile adverse şi rezistenţa medicamentoasă.

Profilaxia. Progrese în această zonă a globului, unde tripanosomiazele reprezintă o problemă complexă de sănătate, s-au realizat prin intermediul programelor de control axate pe eradicarea vectorilor şi terapia persoanelor infectate. Dar pe ansamblu nu au fost găsite modalităţi de combatere a rezervorului animal, reprezentat de antilope pentru *T. rhodensiense*, la care parazitoza este asimptomatică sau la om (posibil şi câini, porci) pentru *T. gambiense*.

Pneumocystis carinii

Este un patogen extracelular care produce infecţii pulmonare la numeroase animale şi om. Ciclul de viaţă constă într-un stadiu de chist o formă vegetativă de trofozoid.

Este un oportunist prezent la numeroase persoane, complet asimptomatice. Pneumonia cu *P. carinii* apare la prematuri, sugari malnutriţi, copii cu imunodeficienţe primare, pacienţi cu terapie imunosupresivă (mai ales corticosteroizi), neoplazici, persoane cu transplant sau SIDA.

Semne clinice. Pacienţii cu pneumonie dată de *P. carinii* acuză dispnee, febră, tuse neproductivă iar la examenul fizic se constată tahipnee, tahicardie, cianoză. Radiografia pulmonară indică infiltrate difuze bilaterale. In lipsa terapiei se ajunge la deces.

Terapia. Se utilizează doi agenţi eficienţi: trimetoprim-sulfametoxazol şi izetionat de pentamidină ca alternativă.

Deoarece *P. carinii* este transmisibil , se impune izolarea pacienţilor cu penumocistoză de contactul direct cu gazdele susceptibile.

Infecţii helmintice

Nematode

Nematodele sunt viermi cilindrici, simetrici, alungiţi; cele mai multe specii trăiesc liber în natură dar unele specii sunt paraziţi ai plantelor şi animalelor.

Trichinela spiralis

Infecţia umană cu *T. spiralis* (trichinoza) este accidentală, deoarece organismul parazitează mai ales animalele carnivore şi omnivore.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ciclul biologic. Trichinoza apare după consumul de carne de porc contaminată. După consumul de carne infectată, larvele inchistate sunt eliberate sub acţiunea acidului gastric şi a pepsinei. Larvele invadează mucoasa intestinului subţire şi în două zile devin viermi adulţi. După o săptămână, femela eliberează noi larve care trec în sânge şi sunt transportate în celulele musculare striate unde se închistează, modificând esenţial structura fibrelor musculare (Fig.17.8).

Trichinoza la om poate fi dobândită şi de la carnea altor animale-câine în Asia şi Africa, cal în Italia sau Franţa, urs sau morsă în regiunile nordice.

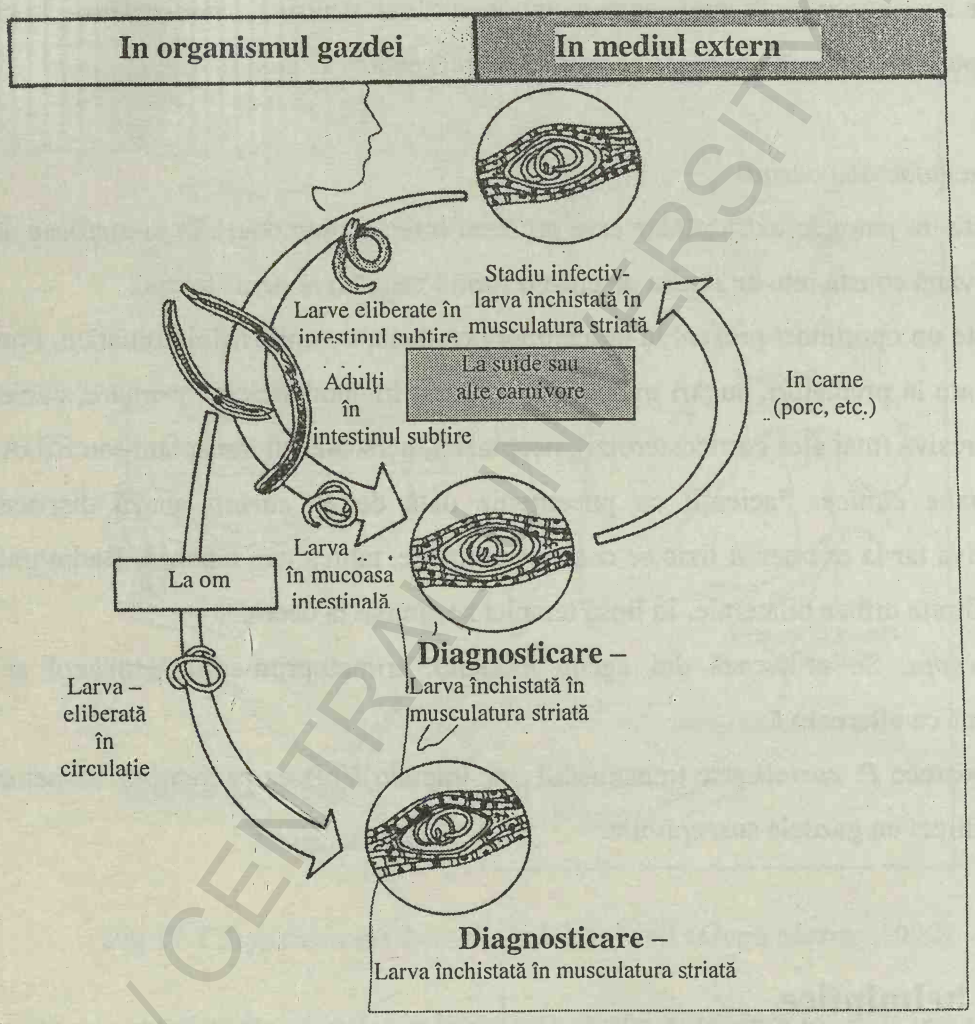


Fig.17.8 *Trichinella spiralis*. Ciclul de viaţă (După Murray,

Aspecte clinice. Infecţiile uşoare (<10 larve/g masă musculară) sunt asimptomatice. Prin invazia masivă a larvelor apr diaree, durere abdominală, constipaţie, greaţă, vărsături. Larvele provoacă o reacţie marcată de hipersensibilitate, cu febră şi eozinofilie. Apar uneori edeme faciale şi periorbitale, hemoragii subconjunctivale, retiniene, la nivelul patului subunghial. In infecţiile grave apar simptome neurologice (psihoze, meningoencefalite, accidente cerebrovasculare). Decesul poate survine când se instalează miocardita, encefalita şi pneumonia.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Terapie. Antiheminticele sunt ineficiente față de larvele de *Trichinella* din mușchi. Pacienții cu infecții ușoare se restabilesc fără complicații. In formele severe sunt recomandați steroizii. Mebendazolul și tiabendazolul sunt active în stadiile enterice ale parazitului.

Profilaxie. Larvele sunt distruse prin prepararea cărnii de porc până își pierde culoarea rozalie sau prin congelare la 1-15^{0}C timp de 3 săptămâni.

Enterobius vermicularis

Este mai frecvent în regiunile temperate. Forma adultă are aproximativ 1cm lungime și este prezent în lumenul intestinal. Femela migrează în regiunea perianală în timpul nopții și elimină până la 10 000 ouă mature. Ouăle devin infectante în curs de câteva ore și prin intermediul mâinilor ajung în cavitatea bucală. Larvele eclozează și se maturizează în intestin (Fig.17.9).

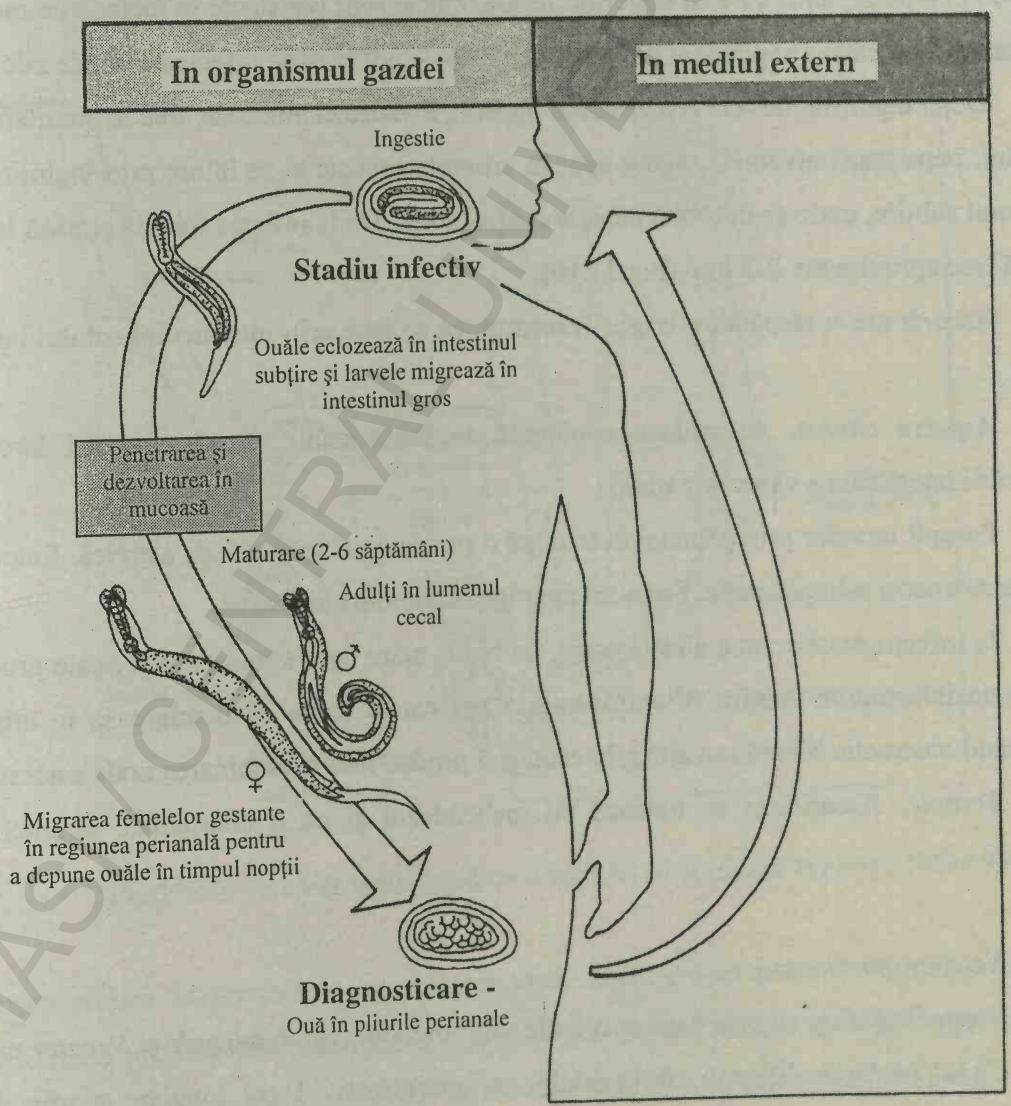


Fig.17.9 *Enterobius vermicularis.* Ciclul de viață (După Murray, 1990)

BCU IAȘI CENTRA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Transmiterea interumană este foarte uşoară şi boala produsă, oxiuraza, este frecventă printre membrii familiei şi persoanele instituţionalizate. Autoinfecţia se produce prin transportul din zona perianală, pe mâini sau sub unghii, în gură.

Aspecte clinice. Numeroşi copii şi adulti sunt asimptomatici. Pruritul perianal (mai ales noaptea) este simptomul principal. Infecţiile masive determină dureri abdominale şi pierdere ponderală. Viermii pot migra în vagin şi produc vulvovaginite şi granuloame.

Terapie. Medicamentul de elecţie este pirantel-pamoat şi ca alternativă mebendazol.

Ascaris lumbricoides

Este un parazit mare, ajungând până la 40 cm lungime.

Ciclul biologic. Viermii trăiesc în lumenul intestinului subţire. Femelele produc până la 200.000 ouă pe zi, eliminate cu materiile fecale. Ouăle sunt rezistente la factorii de mediu şi devin infectante după câteva săptămâni de maturare pe sol şi pot rămâne infectante ani de zile.

După înghiţire, larvele eclozează în intestin, invadează mucoasa, trec în circulaţie şi ajung în plămâni, penetrează alveolele, ajung apoi în arborele bronşic şi se întorc prin înghiţire din nou în intestinul subţire, unde se dezvoltă până la stadiul adult. De la infecţia iniţială şi până la producerea de ouă trec aproximativ 2-3 luni (Fig.17.10).

Ascaris are o răspândire largă. Transmiterea se face prin intermediul solului contaminat cu fecale.

Aspecte clinice. Ascaridoza evoluează în două stadii: etapa migraţiei larvei şi etapa localizării intestinale a viermilor adulţi.

Pasajul larvelor prin plămâni determină o pneumonie nespecifică, alergică. Etapa intestinală evoluează uneori asimptomatic. Frecvent apar însă simptome digestive.

In infecţii masive, mai ales la copii, un bolus mare de viermi agregaţi poate produce durere şi ocluzia intestinului subţire. Viermii solitari pot cauza boala când migreaza în arborele biliar producând obstrucţie biliară sau ajung în esofag şi produc tuse şi eliminarea orală a acestuia.

Terapie. Ascaridoza se tratează cu mebendazol şi ca o alternativă, pirantel pamoat şi piperazin.

Necator americanus

Viermele cârlig, cu cele două specii ale sale:*Ancylostoma duodenale* şi *Necator americanus*.

Ciclul biologic. Viermii cârlig adulţi, au aproximativ 1 cm lungime şi prin dinţi bucali (*ancylostoma*) sau lame tăioase (*Necator*) se fixează pe mucoasa intestinului subţire aspirând sânge (0,2ml zilnic pentru fiecare vierme) şi lichid intestinal. Ouăle ajung pe sol cu fecalele, unde larvele

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rabditiforme eclozează şi se transformă în larve filariforme infectante. Larvele infectante străbat tegumentul şi pe cale sanguină ajung în plămâni, invadează alveolele, urcă în căile respiratorii şi prin înghiţire ajung în intestinul subţire.

Infecţia cu viermii cârlig este răspândită pretutindeni dar mai ales în zonele tropicale şi subtropicale.

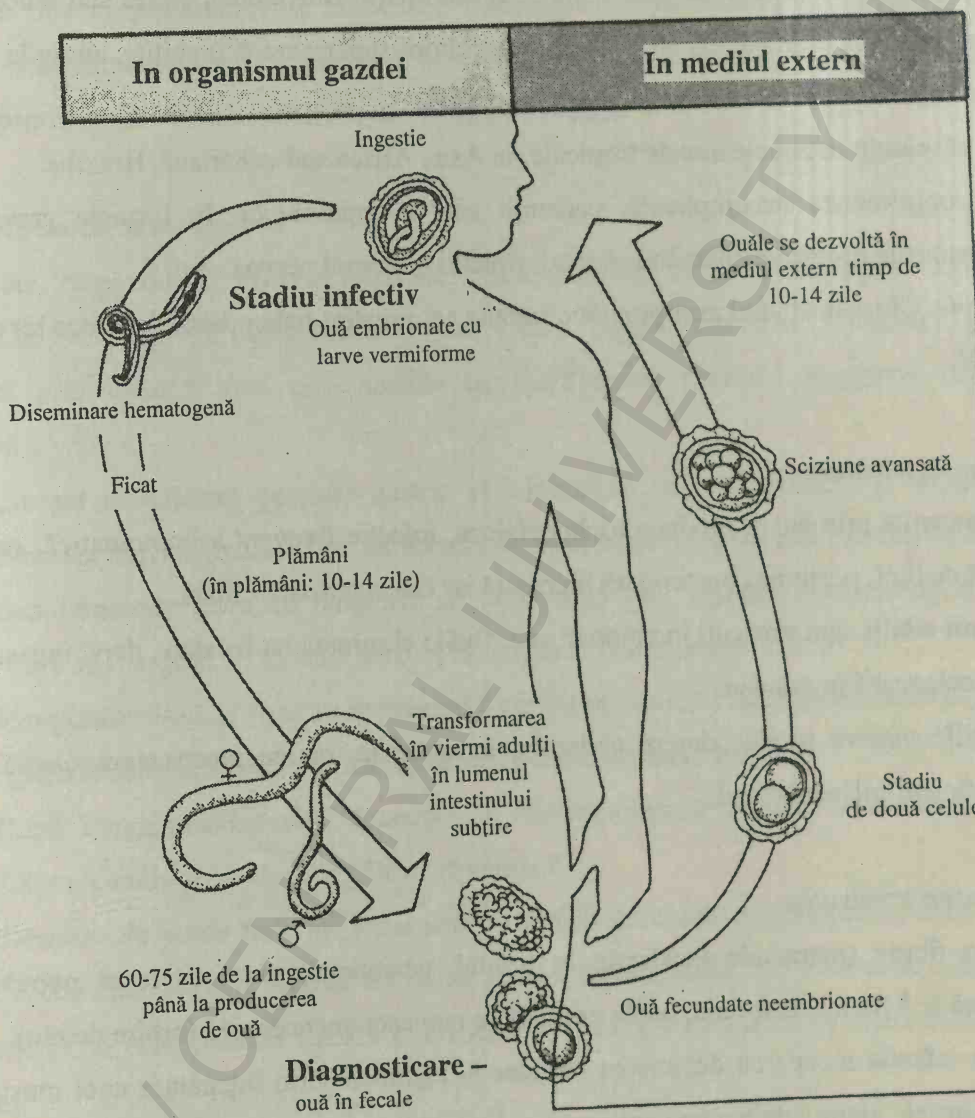


Fig.17.10 *Ascaris lumbricoides*. Ciclul de viaţă (După Murray, 1990)

Aspecte clinice. Migrarea larvelor poate provoca reacţii eritematoase şi veziculare cu prurit. In faza intestinală precoce pot cauza durere epigastrică, diaree inflamatorie sau alte simptome abdominale. Consecinţa principală a infecţiei cronice cu viermi cârlig este deficitul de fier.

Terapie. Medicamentul de elecţie este mebendazol şi pirantel-pamoat ca alternativă. Terapia cu fier este indicată pentru restabilirea nivelului normal al hemoglobinei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Strongiloydes stercoralis

Produce strongiloidoza iar parazitul se înmulţeşte în gadza umană, întreţinând astfel ciclurile de autoinfecţie prin producerea internă a larvelor infectante. La gazdele imunocompromise, un număr mare de larve diseminează în organism şi pot fi fatale.

Ciclul de viaţă poate fi parazitar dar şi liber în sol. Strongiloidoza poate fi dobândită în urma contactului cu solul contaminat cu fecale, când larvele filariforme străbat pielea sau mucoasele. Pe cale sanguină ajung în plămâni, de aici în căile respiratorii superioare şi înghiţite, ajung în intestinul subţire. Femelele adulte se înmulţesc prin partenogeneză.

Este răspândit în zonele umede tropicale, în Asia, Africa sud-sahariană, Brazilia.

In strongiloidoza necomplicată, pacienţii sunt asimptomatici. In formele grave larvele invadează ţesuturile digestive, plămânii, ficatul, rinichii, sistemul nervos central.

Terapie. Chiar în stadiul asimptomatic trebuie administrat tiabendazol deoarece hiperinfecţia poate fi fatală.

Trichuris trichiura

Se transmite prin sol şi produce trichocefaloza, infecţie frecvent asimptomatică. Are formă caracteristică de bici; porţiunea posterioară îngroşată iar cea anterioară efilată.

Viermii adulţi sunt prezenţi în colon şi cec. Ouăle eliminate cu fecalele, după ingestie ajung în intestin şi eclozează în duoden.

Infecţiile masive produc durere abdominală, anorexie, diaree mucosanguinolentă. Pentru terapie este eficient mebendazolul.

Onchocerca volvulus

Este o filarie (nematode localizate în ţesutul subcutanat) care afectează populaţia din America Latină şi Africa ecuatorială; boala produsă se numeşte oncocercoză (orbire de râu).

La om infecţia începe cu depunerea larvelor în tegument prin înţepătura unei muşte negre hematofage. Larvele ajung adulţi care sunt prezenţi în noduli subcutanaţi. După 7 luni-3 ani, femela eliberează microfilarii care sunt ingerate de muscă din pielea gazdei. Femela are lungimea de 40-60cm iar masculul 3-6cm.

Sub acţiunea mecanică şi iritativă a viermilor adulţi are loc pierderea elasticităţii fibrelor şi atrofia epidermului ceea ce duce la formarea de ţesut cutanat excesiv şi la hipo sau hiperpigmentare.

Cea mai gravă complicaţie a oncocercozei este diminuarea acuităţii vizuale. In infecţii masive apar leziuni ale corneei care progresează până la orbire.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Terapie. Ivermectina este medicamentul de elecție, cu administrare în doză unică, orală (150μg/kg) anual sau la 6 luni. Pentru o schemă completă se recomandă suramina sub supravegherea funcției renale.

Excizia chirurgicală a nodulilor este indicată când aceştia sunt localizați la nivelul capului, datorită proximității viermilor adulți față de globul ocular.

Ca măsuri profilactice se recomand insecticide pentru controlul vectorilor şi haine de protecție pentru muncitorii care lucrează în zonele infestate cu muşte, dar aceste măsuri nu sunt posibile pentru majoritatea locuitorilor din zonele endemice.

Dracunculus medinensis

Este răspândit în Africa tropicală, zona Nilului, Orientul Mijlociu, India Pakistan. Parazitează omul dar şi unele animale (cal, câine, pisică, carnivore sălbatice). Infecția este dobândită prin ingestia apei care conține larve infectante prezente în gazda intermediară – crustaceul *Cyclops.*

Larvele traversează peretele gastric sau intestinal, se maturizează şi se împerechează. Femela *Dracunculus* migrează în țesuturile subcutanate, frecvent la nivelul extremităților inferioare. Localizarea femelelor (care au lungimea de 30cm-1m) sub tegument, determină formarea unei vezicule care se sparge şi un număr mare de microfilarii se eliberează în apă.

Manifestări clinice. Apar în momentul formării veziculelor,când încep febra şi manifestările alergice generalizate (urticarie, grețuri, vărsături, diaree, dispnee, cefalee).

După eliminarea larvelor, femelele se autoexpulzează treptat, mor, se resorb, sau se calcifică, iar ulcerația se vindecă în câteva săptămâni.

Terapie. Se poate face un tratament cu tiabendazol sau metronidazol, care pot diminua siptomele, dar eficiența este incertă. Extracția gradată a parazitului prin rularea pe o baghetă, câțiva centimetri pe zi, este metoda uzuală şi eficientă. Profilaxia constă în evitarea contaminării apei potabile.

Trematode

In ciclul biologic trematodele (viermi plați nesegmentați) trec prin mai multe gazde: viermii adulți parazitează omul şi alte vertebrate iar larvele parazitează una sau mai multe gazde intermediare, din care prima este o moluscă (melc).

Fasciola hepatica. (trematod cu localizare hepatică). Este agentul etiologic al fasciolozei umane şi este singurul trematod semnalat la noi în țară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Are aspect foliaceu (2-3cm lungime şi 1-1,5cm lăţime) şi culoare alb-gălbuie. Parazit al oilor şi altor rumegătoare, infectează accindental omul.

Ciclul biologic. Rumegătoarele se infectează prin ingerarea metacercarilor inchistaţi prezenţi pe vegetaţia acvatică. In duoden părăsesc chistul, trec prin intestin, invadează ficatul şi se localizează în căile biliare. Pentru maturare are nevoie de cel puţin 3-4 luni (Figura 11). Ouăle sunt neembrionate şi sunt eliminate prin fecale. In apă eclozează şi eliberează un embrion care infectează gazda intermediară, melcul *Lymnea* se transformă în sporocist apoi în altă formă larvară, redie. Din redii se formează cercarii larve eliminate de melc în apă, unde înoată liber. După inchistare se fixează pe vegetaţia acvatică. (Fig.17.11).

Patogenitate. Severitatea infecţiei depinde de intensitatea şi durata acesteia. La suprafaţa ficatului se observă hemoragii punctiforme, traiecte de scleroză, noduli.

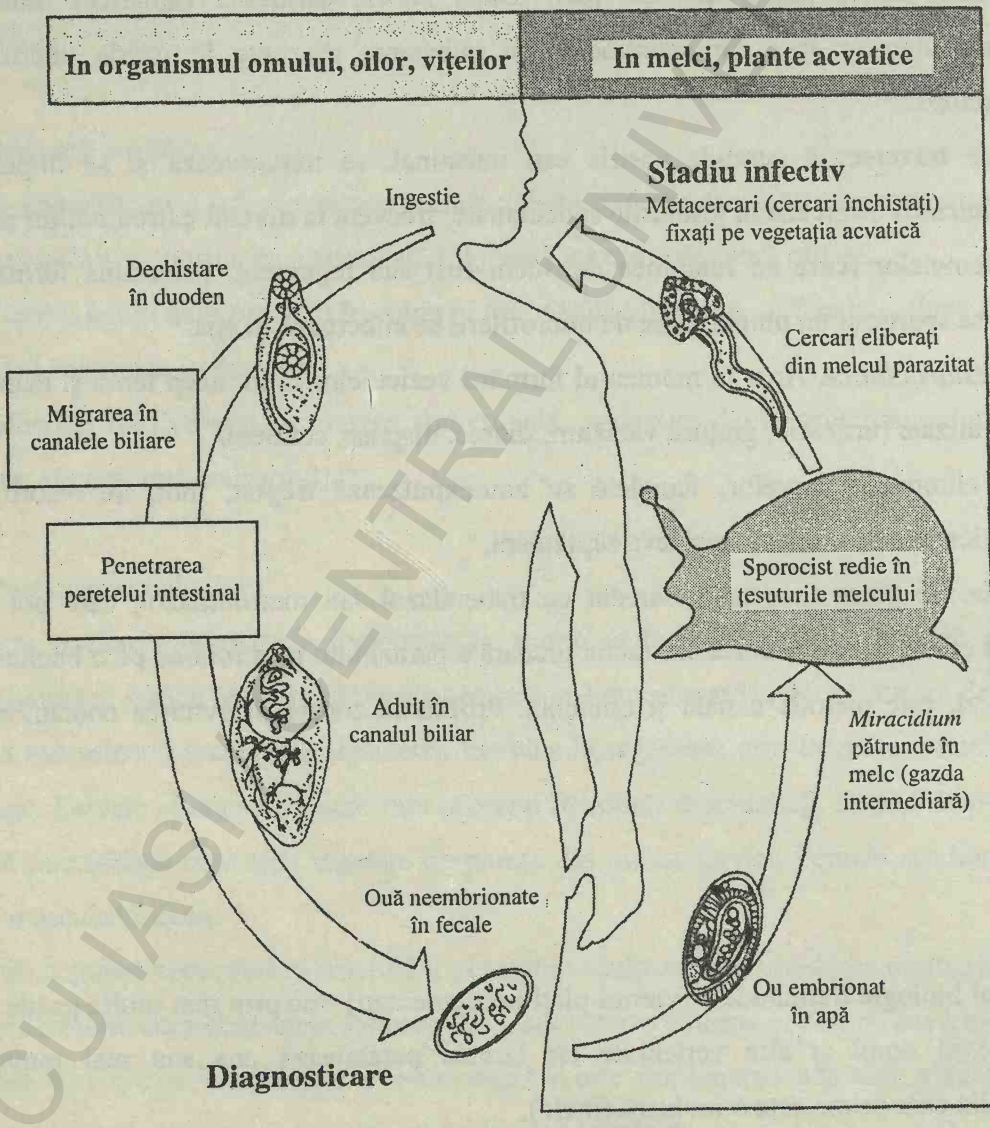


Fig.17.11 *Fasciola hepatica*. Ciclul de viaţă (După Murray, 1990)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Manifestări clinice. Obstrucția căilor biliare duce la colică biliară, pusee de icter şi la complicații infecțioase. Sunt frecvente greața, diareea, tuse, urticaria, în cadrul manifestărilor toxicoalergice ca urmare a substantelor toxice, alergizante eliberate de viermi. Netratată, fascioloza hepatică evoluează spre ciroză hepatică.

Tratamentul de elecție se face cu bitinol. Experimental s-au dovedit eficienți alți doi compuşi: triclabendazol şi albendazol.

Cestode

Cestodele sunt viermi lați segmentați. Adulții sunt prezenți în tubul digestiv iar larvele în diverse organe.

Tenia solium

Produce la om cisticercoza. Omul este gazda definitivă iar porcul, dar şi pisicile, câinii, oile, gazde intermediare.

Forma adultă se găseşte în general în jejunul superior şi se ataşează de mucoasă prin scolex care are două ventuze şi două cordoane de cârlige.

Adultul poate trăi până la 25 ani; are lungimea de aproximativ 3 m şi 1000 proglote.

Ciclul de viață. După ingestie de către gazda intermediară, ouăle conținute în proglote, embrionează, penetrează peretele intestinal şi ajung în diverse țesuturi, mai ales în mușchii striați ai gâtului, limbii, trunchiului. In 60-90 zile se dezvoltă stadiul larvelor inchistate (cisticerci). La om infecția intestinală se produce prin consum de carne cu cisterci insuficient preparată termic (Fig.17.12).

Manifestări clinice. Infecțiile intestinale sunt în general asimptomatice. In cisticercoză sunt frecvente manifestările neurologice. La locul de ataşate intestinul este iritat şi apar greața, crampe, pusee de diaree, modificări ale apetitului.

Terapia se realizează cu niclosamida sau prazinquantel. Ca măsură profilactică se impune evitarea consumului de carne de porc insuficient preparată termic.

Echinococcus granulosus

Este o tenie de dimensiuni mici:3-6mm lungime. Stadiile larvare de *Echinococcus granulosus* produc echinococoza, bolaă prezentă în Australia, America de Sud, Africa, estul Europei, Orientul Mijlociu, bazinul mediteranean, mai ales Liban şi Grecia.

Gazdele definitive sunt câinii, care elimină ouăle în fecale. Gazdele intermediare – oi, bovine, capre, cămile, ingeră ouăle şi în organismul lor se dezvoltă larvele. Dacă câinele ingeră carnea care conține chisturi, ciclul biologic este finalizat.

BCU IAŞI CETITRA UNIVERSITY LIBRARY

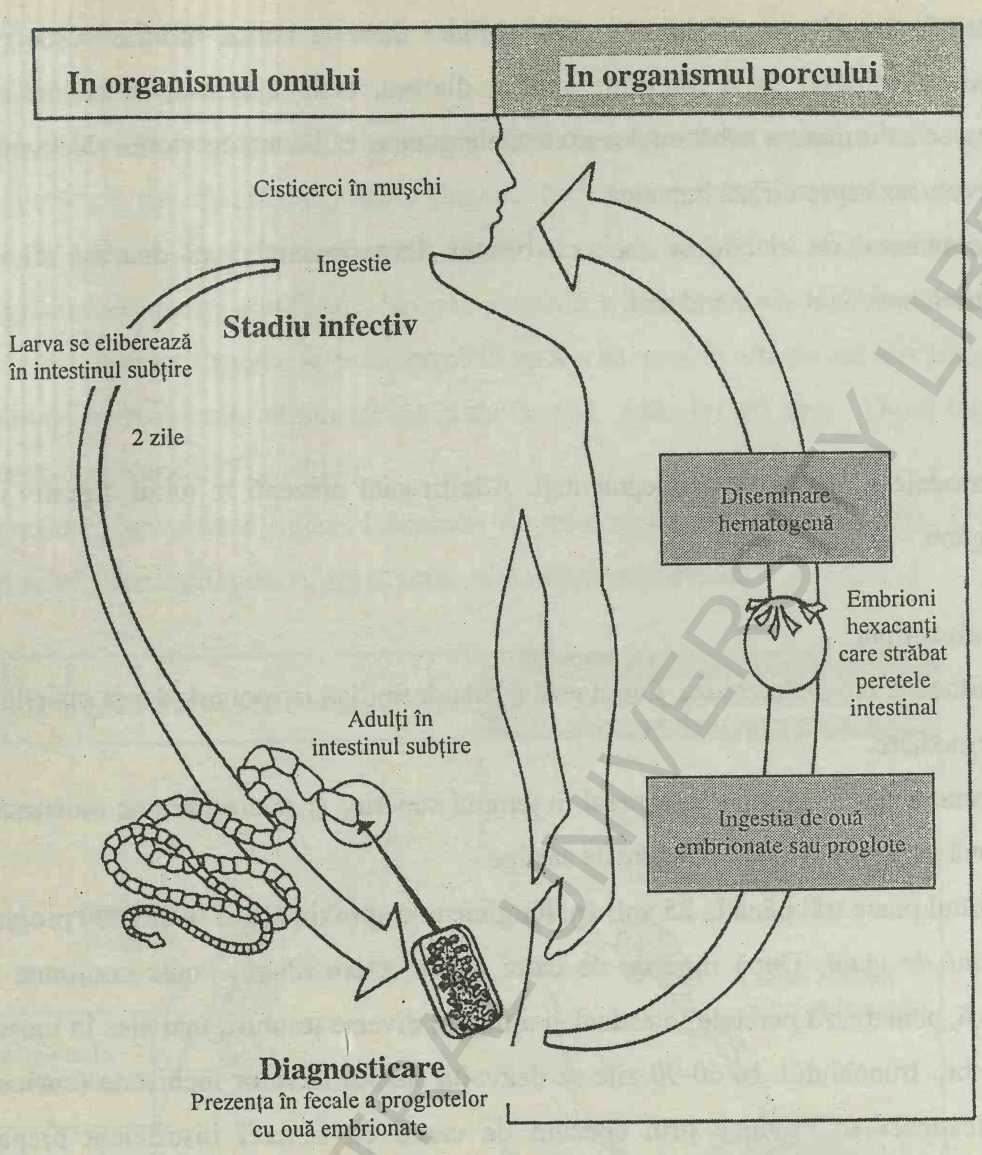


Fig.17.12. *Tenia solium.* Ciclul de viață (După Murray, 1990)

Ciclul biologic. După ingestie, ouăle ajunse în intestinul omului, germinează şi penetrează mucoasa intestinală, trec în circulația sanguină şi larvele disemineză în diverse organe, frecvent ficat şi plămâni. (Fig.17.13).

Larvele se dezvoltă în chisturi hidatice pline cu lichid. Chisturile fiice se dezvoltă pe fața internă a stratului intern sub formă de vezicule proligere în care se dezvoltă noi larve. Chistul se măreşte în cursul anilor .

Manifestările clinice. Chistul hidatic prin creşterea lentă în viscere, induce compresie, reacții iritativ-inflamatorii, toxice, infecțioase (prin suprainfecția bacteriană a acestuia). Evoluția chistului hidatic poate fi asimptomatică ani de zile. In ficat, chistul presează tractusul biliar şi vasele sanguine, cauzând durere şi obstrucție biliară.

In plămân, produc tuse, durere toracică sau hemoptizie. Invazia cavității medulare duce la eroziune osoasă. Chistul hidatic cerebral induce un tablou clinic de tumoră cerebrală, cu hipertensiune intracraniană.

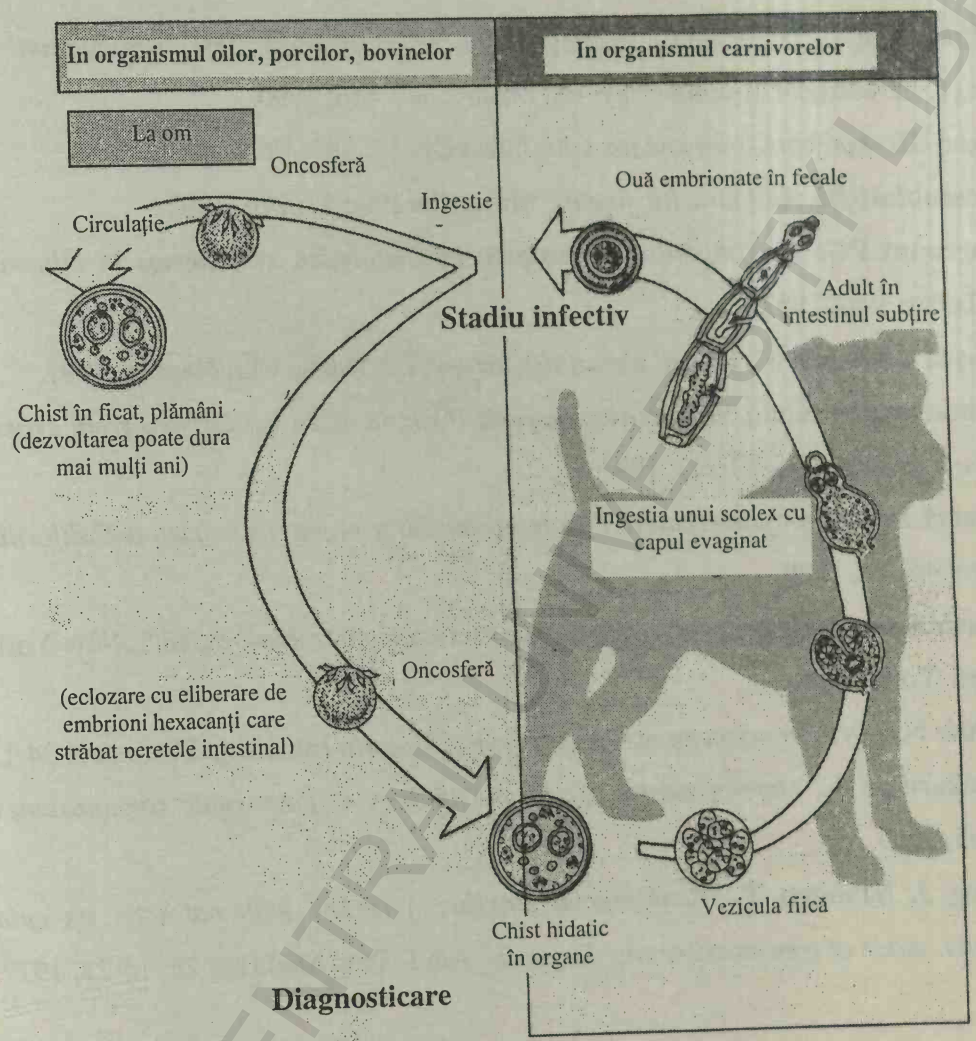


Fig.17.13. *Echinococcus granulosus*. Ciclul de viață (După Murray, 1990)

Tratamentul de elecție este chirurgical dar există riscul scurgerii lichidului din chist.

Albendazolul are acțiune antiechinocococică. In regiunile endemice echinococoza poate fi prevenită prin tratamentul cu praziquantel al câinilor infectați .

Profilaxia umană urmăreşte evitarea contactului prea strâns cu câinii, respectarea normelor de igienă individuală şi alimentară.

BCU ASE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

Liu XL, Weller PF. *Nematode intestinale*. In Harrison: Principiile medicinei interne, Ed. Teora 1021-1025, 1998.

Murray RP, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. *Introduction to medical parasitology*. In: Medical Microbiology, Ed. Mosby, 349-436, 1990.

Reed SL. *Amebiasis: an update*. Clin Infect Dis 14: 385, 1992.

Rosenblatt JE. *Antiparazitic agents*. Mayo Clin Proc 67: 276, 1992.

Sageaunt PG. *The reliability of* ***Entamoeba histolytica zymodemes*** *in clinical diagnosis* Parasitol Today 3:40, 1987.

Gaşcă CJ, Junie M. *Infecţii parazitare umane*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1997.

Schaefer JW, Khan MY. ***Echinococcosis*** *(hydatid disease): Lessons from experience with 59 patients*. Rev Infect Dis 13:243, 1991.

Scharf D. ***Neurocysticercosis****: Two hundred thirty eight cases from a California hospital.* Arch Neurol 46: 77, 1989.

Washington JA. *Laboratory procedures in clinical microbiology*, ed 2, New York, Springer Verlag, New York, 1985.

White NJ. *Drug treatament and prevention of Malaria* Eur J Clin Pharmacol 34:1, 1988.

Wickerman K. *Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes*. Br Med Bull 41: 105, 1985.

Yang J, Scholten T. ***Dientamoeba fragilis****: a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission and diagnosis*. Am J Trop Med Hyg 26: 16-22, 1977.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MICROBIOLOGIE FARMACEUTICA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18

Microorganisme care afectează industria farmaceutică

Calitatea produselor farmaceutice depinde de condiţiile în care sunt produse şi de materialele utilizate pentru prepararea lor. Produsele care se sterilizează terminal, în ambalaj propriu, sunt sterile, dar formele medicamentoase nesterile conţin contaminanţi care provin din materiile prime, din echipamentele de fabricaţie, din atmosferă, de la personalul de producţie sau de la ambalajul final. Mulţi din aceşti contaminanţi sunt patogeni, alţii cresc în prezenţa prezervanţilor şi contaminează produsul. Fragmente din celula microorganismelor omorâte prin căldură în diferite etape de producţie pot fi toxice sau pirogenice (ex. lipidul A din peretele celulei).

Aerul

Microorganismele din aer

Microorganismele nu cresc şi nu se multiplică în aer deoarece acesta nu este un mediu care să le ofere sursele nutritive adecvate. Totuşi unele pot supravieţui în aer, în condiţii prelungite de uscăciune. Microflora aerului provine din sol, apă, substanţe organice, plante, animale, om. Numărul microorganismelor din aer depinde de condiţiile climatice; vaporii de apă înlesnesc menţinerea şi plutirea microorganismelor iar curenţii de aer le antrenează pe distanţe mari.

Iarna aerul este mai puţin încărcat cu microorganisme. Aerul din spaţiile populate conţine mai multe microorganisme decât aerul liber. Microorganismele sunt purtate de particule de praf, pe haine, pe picăturile de secreţii eliminate în timpul vorbitului, tusei, strănutului.

Din aer se izolează frecvent bacterii sporulate şi nesporulate (*Bacillus spp., Clostridium spp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Corynebacterium spp*), ciuperci (*Rhodotorula spp.), mucegaiuri (Penicillinum spp., Cladosporium spp., Aspergillus spp., Mucor spp*), protozoare.

Cantitatea de microorgansme din aer creşte în cursul manipulării materialelor contaminate în scopul distribuirii, încorporării în diverse produse. Numărul de mucegaiuri creşte semnificativ în spaţiile unde se manipulează amidonul şi zaharurile sub formă de pulbere. Numeroase materiale de

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mari. Reacția dintre luciferază (enzimă obținută din licurici) și luciferină (provenită din diverse surse) are loc cu consum de ATP și emitere de lumină. Când luciferaza și luciferina sunt în exces, emiterea de fotoni (lumină) este în funcție de concentrația de ATP. Sistemul poate măsura cantitatea de ATP din cel puțin 1 000 celule. Această tehnică este adecvată pentru evaluarea numărului de microorganisme din apa pentru formele injectabile. Pentru a analiza cu acuratețe apa pentru injecții prin această metodă, trebuie filtrată (membrana filtrantă cu dimensiunea porilor de 0,45 microni) o cantitate de aproximativ 20 l; se poate identifica prezența a 10 bacterii/100ml apă. Filtrul este demontat și este spălat cu o soluție 0,1N HNO_3 într-o cameră de reacție la care se adaugă luciferina și luciferaza. Emisia luminoasă este interpretată funcție de concentrația bacteriană (sau ATP).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

Microflora tegumentului și a tractsului respirator

Suprafața pielii, la contactul cu mediul exterior nu este sterilă; ecosistemul microbian prezent la acest nivel este bogat și variabil, cu rol esențial pentru echilibrul fizico-chimic al tegumentului. Microorganismele sunt adaptate la ecosistemul cutanat; aici găsesc nutrienții necesari pentru creștere, furnizați de sebum, transpirație, resturi celulare.

Flora microbiană a pielii este constituită din bacterii și ciuperci adaptate la condițiile ecologice oferite de epidermă; sunt prezente bacterii Gram-pozitive mai rezistente la absența umidității decât speciile Gram-negative, aerobe și anaerobe în zonele profunde ale anexelor. Numărul bacteriilor prezente pe tegument variază funcție de diferitele zone cutanate (Tabel 18.4).

Flora bacteriană rezidentă este constituită din specii prezente permanent sau pentru perioade îndelungate pe tegument; flora tranzitorie este reprezentată de specii care rămân pentru scurt timp pe tegument și provin fie din mediu, fie din tubul digestiv și este constituită din: *Pseudomonas spp.*, streptococi de grup A, enterococi, tulpini de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, ocazional spori de *Bacillus spp.* și *Clostridium spp.*, *Acinetobacter*, dermatofiți (*Epidermophyton spp.*, *Trichophyton spp.*). În procesul de refacere constantă a epidermei, squamele cutanate încărcate cu bacterii sunt eliberate în mediu prin intermediul hainelor, a curenților de aer.

Microorganismele ajung în produsele farmaceutice în timpul procesului de fabricație. Pot contamina pulberile și tabletele, soluțiile, suspensiile, produsele parenterale, cu consecințe grave pentru pacienți.

Staphylococcus aureus este una din speciile a cărei prezență este nedorită; prezent pe mâini, față, persistă în straturile profunde ale tegumentului și nu poate fi eliminat prin spălare.

Flora fecală, bacteriile prezente în răni sunt transferate produselor farmaceutice de către operatorii a căror igienă personală este defectuoasă. Leziunile care prezintă semne de infecție pot fi

contaminate cu *S. aureus, Streptococcus pyogenes*, enterococi, coliformi, *Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa.*

Partea superioară a tubului digestiv, orofaringele, este colonizată cu o floră microbiană bogată, constituită mai ales din bacterii comensale.

Tabel 18.4 Densitatea florei microbiene rezistente în diferite regiuni ale tegumentului

Zona tegumentară	Număr total /cm^3	Stafilococi	Corynebacterii	*Propionibacterium spp*	*Malassezia furfur*
Pielea acoperită cu păr	4-5[a]		4,6		
Fața	2-5	4-5	4,2	4,5	1,5
Narine anterioare	3-4		5,2		
Axila	5,8		4,7-5,8[b]	3,7	
Abdomen	6				
Zona perianală			3,6[b]		
Gambe			3,6[b]		
Picioare (tălpi)		3,4-5,5	4,2	1,3	6,7
Spații interdigitale (de la picioare)		2,5	2,4	1,5	0,5
Mâini		4-7			
Antebrațe și plica cotului		1,2-5,6		2,1	
Torace		3,5		4	3,5
Spate		3		3,5	3

a – $\log_{10}$ din numărul de bacterii/cm^2;

b – corynetobacteriile lipofile sunt foarte abundente în anumite zone (4 - 7,7 $\log_{10}$)

În căile nazale este prezent mai ales *S. aureus;* nasofaringele este colonizat cu *Streptococcus viridans, Streptococcus salivarius, Neisseria pharyngis*. Ocazional sunt prezenți *Klebsiella pneumoniae* și *Haemophilus influenzae*. În timpul respirației normale se elimină mai ales streptococii din grupul *viridans*. Microorganismel de contaminare fecală sunt reprezentate de *Enterococcus faecalis, Enterobacter aglomerans, E. cloacae, E. coli*, enterovirusuri, virusul hepatitei A

Probabilitatea ca personalul să contamineze preparatele farmaceutice se poate minimaliza prin respectarea unor reguli riguroase de igienă și control medical periodic pentru a identifica eventualii purtători de microorganisme patogene.

Sectoarele unde se prepară produsele injectabile și de uz oftalmic sunt prevăzute cu instalații de spălare și uscare cu aer, la intrarea în zonă.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Personalul care participă la obținerea acestor produse este protejat de echipament complet steril, inclusiv mască şi mănuşi. Operatorii reprezintă sursa principală de contaminare a produselor preparate aseptic.

Particulele viabile şi neviabile, care se desprind de pe corp sunt numite " praf uman"; acest praf se desprinde de pe operator cu frecvența de aproximativ 10^7 celule/zi. Praful format mai ales din squame acționează ca suport pentru microorganisme. Aceste suporturi sunt foarte uşoare şi sunt purtate de curenții de aer din jurul operatorului.

Deplasarea personalului în zonele critice, cum ar fi boxele sterile cu aer laminar poate cauza curenți de aer care introduc microorganisme în aceste spații.

Aceasta este cea mai frecventă sursă de contaminare în cursul umplerii recipientelor. Numărul şi mişcarea personalului în camera de umplere trebuie să fie redus la minimum; mersul pe pardoseală, cu încălțăminte sterilă şi mişcarea echipamentului antrenează mişcarea particulelor şi a microorganismelor care sunt absorbite de aceste suprafețe. Filtrele HEPA pentru aer nu pot reține microorganismele care aderă pe încălțăminte şi echipament. Aerul laminar poate curăța numai materialele care sunt suspendate în aer. Particulele care aderă şi microorganismele trebuie îndepărtate sau omorâte înainte ca în camera de umplere să înceapă activitatea.

Metode de evaluare a florei microbiene cutanate

Microorganismele cutanate se găsesc atât pe suprafața cât şi în profunzimea epidermei, dar metodele de prelevare uzuale se referă doar la bacteriile prezente în stratul superficial.

Metodele de evaluare trebuie să țină seama că bacteriile sunt prezente pe tegument sub formă de microcolonii şi dacă nu se efectuează disocierea şi dispersia microcoloniilor, numărarea va da o valoare inferioară celei reale.

Metoda amprentelor

Metoda directă constă în aplicarea pe piele a mediului de cultură agarizat, turnat în placa Petri; după un anumit timp de contact, placa se incubează la 37^0 C şi după 24 – 48 ore, în aerobioză, pe geloză apar colonii microbiene, polimorfe care sunt "amprenta" microflorei de pe tegument (Fig.18.4).

Metoda indirectă constă în ştergerea tegumentului cu un tampon cu care se realizează amprentele pe suprafața mediului agarizat din placa Petri.

Metoda amprentelor nu este cantitativă deoarece microcoloniile nu sunt dispersate.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

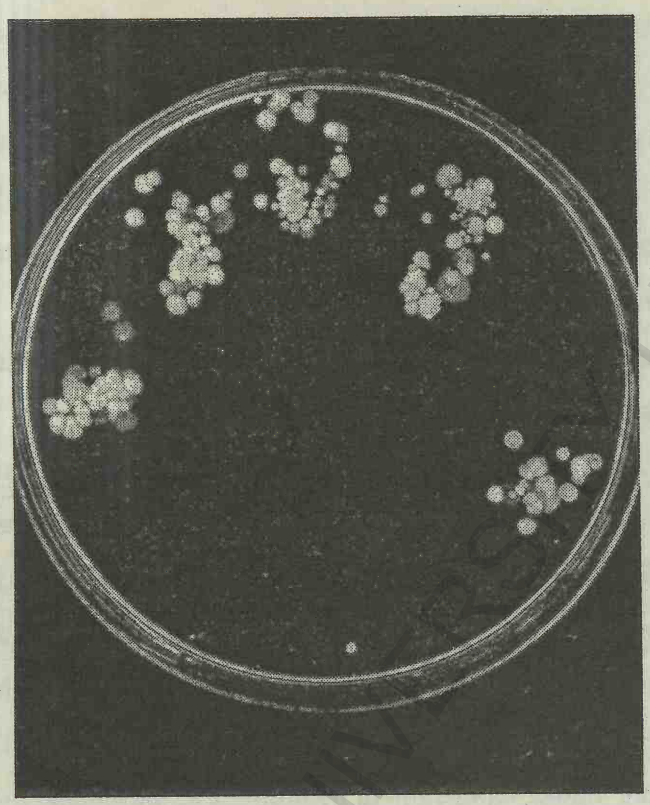


Fig18.4 Colonii bacteriene obținute în placa cu mediu agarizat, prin metoda amprentelor

Metoda prin spălare

Metoda prin spălare este considerată cea mai performantă şi mai reproductibilă; hidratarea stratului cornos permite probabil eliberarea mai bună a microorganismelor. Fleurette şi Transy utilizează un aparat electric care antrenează rotirea unei palete subțiri de cauciuc; presiunea cu care paleta se aplică pe tegument este constantă.

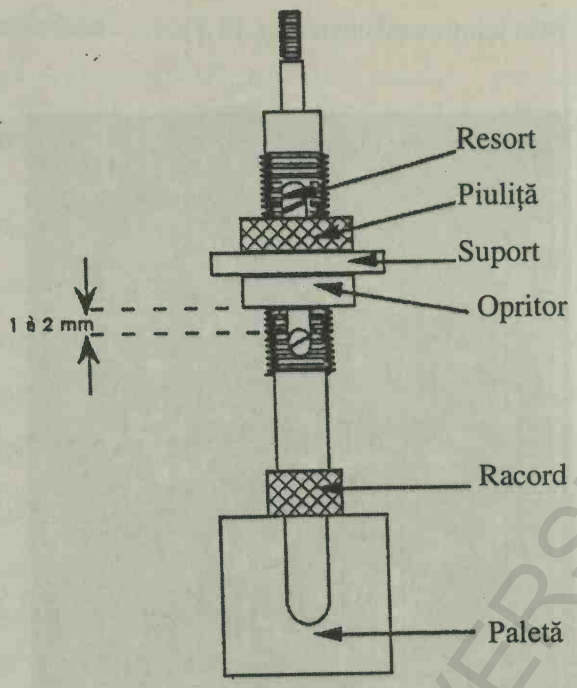
Paleta se roteşte într-un cilindru de sticlă care conține lichidul de prelevare, timp de 15 secunde (Fig.18.5).

Lichidul de spălare este utilizat pentru determinarea numărului bacteriilor, în aerobioză şi anaerobioză.(Fig.18.6)

Metode de prelevare a florei microbiene de pe mâini

Mâinile se pot contamina la contactul cu obiecte, sau cu persoane bolnave şi sunt considerate ca vectori permanenți şi periculoşi.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



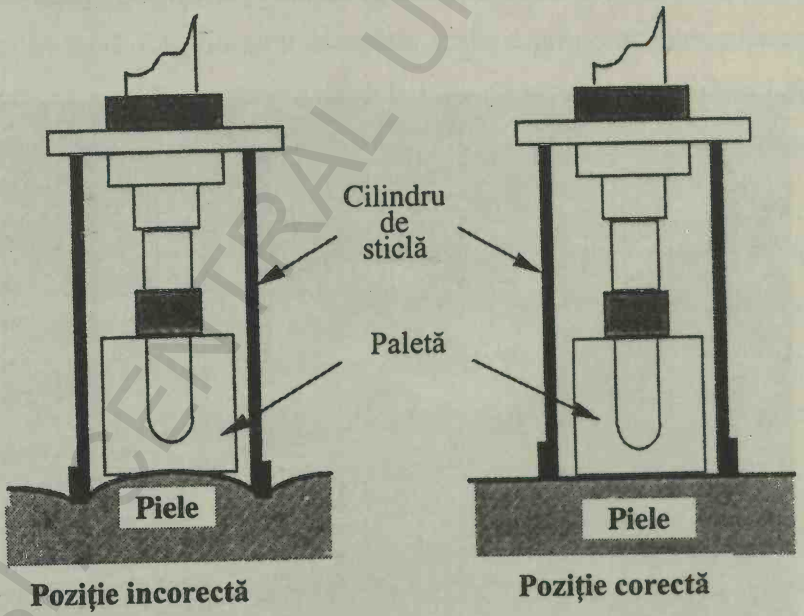


Fig.18.5 Schema aparatului de prelevare prin spălare pentru determinarea numărului de microorganisme cutanate

Metoda mănușii constă în prelevarea bacteriilor de pe tegument prin agitarea mâinii, timp de 15 secunde într-o mănușă chirurgicală sterilă în care este introdus 100 ml lichid (soluție fiziologică). Lichidul este apoi inoculat pentru a se face evaluarea bacteriilor. Altă variantă propusă

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este metoda sacului (mănuşa este înlocuită cu un sac steril din polietilenă) care oferă rezultate asemănătoare cu cele obţinute prin tehnica mănuşii (Fig.18.7).

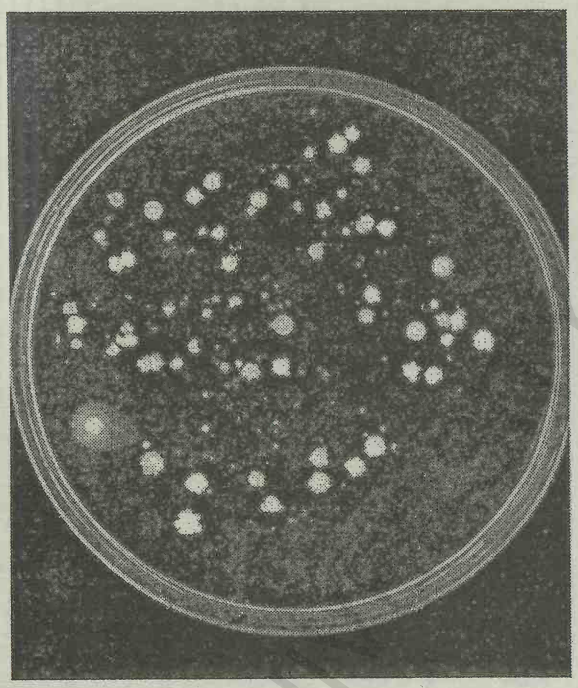


Fig.18.6 Colonii bacteriene dezvoltate pe mediu agarizat după prelevare prin spălare

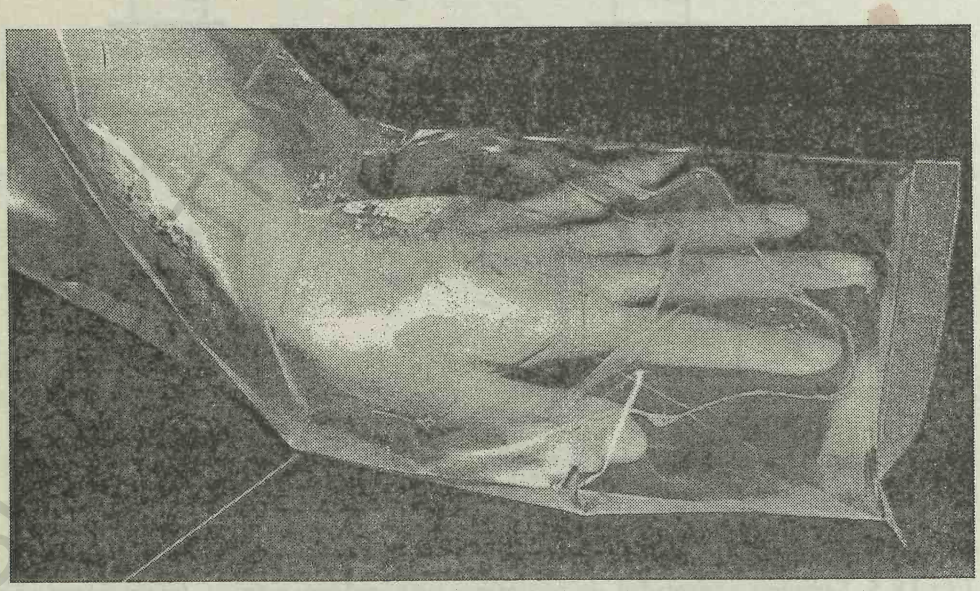


Fig.18.7 Prelevarea bacteriilor de pe mână prin metoda "sacului"

Metode de prelevare a florei orofaringiene

Metodele de prelevare a florei orofaringiene nu sunt încă standardizate. Saliva este recoltată direct; mucoasele şi limba sunt şterse cu un tampon care apoi este descărcat într-un volum

determinat de mediu lichid de cultură, în care se va face numărarea bacteriilor. Se mai pot practica amprente ale limbii şi mucoasei.

Identificarea microorganismelor

Ghidul FDA (Food and Drug Administration, SUA) prevede, referitor la zonele aseptice, identificarea microorganismelor cel puțin până la nivelul de gen. De la personal, în mod frecvent se izolează coci Gram-pozitivi. Izolatele trebuie comparate cu lista microorganismelor care sunt prezente în zonele aseptice şi dacă un microorganism nou este frecvent izolat şi nu face parte din flora normală, trebuie găsită sursa de contaminare.

Materiile prime

Un mare număr de microorganisme sunt introduse în procesul de obținere a produselor farmaceutice prin intermediul materiilor prime; alegerea materialelor cu o calitate microbiologică bună contribuie la controlul nivelurilor de contaminare atât ale produsului cât şi ale instalațiilor în care sunt produse. În mod obişnuit sunt acceptate materii prime contaminate cu microorganisme nepatogene şi testele care se fac urmăresc posibila lor supraviețuire în produsul final şi creşterea în prezența agenților de preservare. De asemenea trebuie evaluată eficiența proceselor de distrugere sau eliminare a acestor microorganisme din produs.

Materiile prime care provin din surse naturale prezintă o microfloră numeroasă şi variată.

Produsele obținute din surse animale: gelatina, pudra de tiroidă, pancreas, etc., pot fi contaminate cu patogeni animali. Organisme oficiale cum ar fi *British Pharmacopoeia* (1993) precizează nivelul până la care aceste materiale pot fi contaminate cu *Escherichia coli* sau *Salmonella spp.*, înainte de a fi utilizate în prepararea produselor farmaceutice.

Materialele de origine vegetală: agarul, guma arabică (*gummi acaciae*), guma tragacantha, pulberea de revent şi amidonul pot conține diverse microorganisme: *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, streptococi, mucegaiuri (*Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*), drojdii sau alte specii, dobândite pe parcursul cultivării. Prezența *Salmonella spp.*, este asociată cu fertilizarea solurilor cu dejecte provenite de la animale. În unele procese de rafinare a materiilor prime, microflora, sub aspectul componenței, se poate modifica. Astfel, prin uscare, numărul sporilor creşte, procesele de solubilizare pot introduce bacterii prezente în apă, cum ar fi *E. coli*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Materiile prime obținute prin sinteze chimice sunt mai puțin contaminate cu microorganisme. Purificarea cu solvenți organici reduce gradul de contaminare. Sunt totuși și excepții: substanțe organice, cum ar fi vitamine, lactoză, glucoză, amidon, lactat de calciu, steroizi, precum și substanțe minerale (carbonat de magneziu sau aluminiu) prezintă diferite grade de contaminare.

Pământurile naturale conțin bacterii anaerobe, mai ales *Clostridium tetani.*

Condițiile de stocare a materiilor prime, mai ales a substantelor higroscopice, poate influența dezvoltarea microorganismelor. Se știe că activitatea apei este de 0,70 pentru drojdii, 0,80 pentru mucegaiuri și 0,91 pentru majoritatea bacteriilor de contaminare și aceasta impune depozitarea materialelor în condiții care nu depășesc aceste niveluri.

Multe ambalaje utilizate pentru materiile prime, cum ar fi sacii de hârtie, absorb umiditatea, se degradează sub acțiunea microorganismelor și contaminează conținutul. Din aceste considerente sunt de preferat sacii din polietilenă.

Materiile prime lichide sau semisolide sunt protejate de substanțe preservante, dar altele, cum ar fi siropurile trebuie să fie suficient de concentrate pentru a preveni creșterea microorganismelor osmofile. Siropurile trebuie menținute la temperatură constantă, deoarece variațiile termice determină evaporarea apei, urmată de condensarea și diluția straturilor superficiale, atingând valori ale activității apei care permit creșterea speciilor osmofile și contaminarea siropului.

Materiile prime, intens contaminate cu microorganisme nepatogene, pot fi utilizate dacă sunt supuse sterilizării înainte sau pe parcursul procesului de producție. Procedeele de sterilizare constau în tratarea termică, filtrare, iradiere, recristalizare cu solvenți bactericizi (alcool), oxid de etilen gazos (pentru produse uscate). Sterilizarea nu mai este necesară pentru materiile prime care intră în componența produsului final în cantități mici și acesta este preservat prin valoarea pH-ului, absența apei din conținut, sau prin adaos de zahăr sau alcool. Dacă produsul este pentru uz parenteral sau oftalmic, sterilizarea reprezintă o etapă esențială. Operațiile la care sunt supuse materiile prime cresc gradul de contaminare a aerului și când acestea sunt depozitate într-o zonă centrală, trebuie luate măsuri suplimentare de precauție. Riscul de contaminare apare mai ales pentru materialele lichide, care se contaminează în întregime.

Ambalarea

Unul din rolurile ambalării este prevenirea pătrunderii microorganismelor sau a umidității, care duc la contaminarea produsului. Microflora materialului pentru ambalaj depinde de compoziția acestuia și condițiile de depozitare.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Flacoanele de sticlă sunt sterile la ieşirea din cuptor, dar adesea sunt păstrate în locuri prăfuite şi împachetate pentru transport în cutii de carton; ca urmare conţin spori de *Penicillinum spp.*, *Aspergillus spp.*, bacterii (*Bacillus spp.*)

Flacoanele trebuie spălate pentru îndepărtarea prafului, a fragmentelor de sticlă şi apoi dezinfectate. Flacoanele din material plastic conţin un număr mic de microorganisme şi nu necesită dezinfecţie; pot fi contaminate, mai ales cu spori de mucegaiuri, când sunt transportate în ambalaje necorespunzătoare.

Materialele de ambalaj care au suprafaţa netedă, fără cute sau interstiţii (acetat de celuloză, polietilena, polipropilena, clorură de polivinil, folii metalice) au pe suprafaţa lor un număr mic de microorganisme.

Ambalajele de hârtie sau carton, dacă nu sunt tratate, conţin spori de *Cladosporium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillinum spp.*, bacterii cum ar fi *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.*

Marginile de închidere ale cartonului sau dopului, dacă nu sunt protejate cu preservanţi, cu folii metalice sau ceară, sunt surse de contaminare cu mucegaiuri.

Dopurile de plastic prezintă riscuri mai mici de a introduce sau a fi suport pentru creşterea microbiană. Dacă este necesar, dopurile se sterilizează cu formaldehidă sau oxid de etilen gazos.

Ambalajele pentru produsele injecatbile sau oftalmice, care sunt produse în condiţii aseptice şi nu pot fi sterilizate în containerul final, trebuie obligatoriu sterilizate, de obicei prin căldură uscată, la 170^0 C.

Flacoanele şi dopurile pot fi sterilizate şi prin căldură umedă, prin metode chimice sau iradiere, dar trebuie urmărită prezenţa pirogenelor bacteriene.

Clădirile

Pereţii şi tavanul. Pe tavan şi pereţi, mai ales în încăperile prost ventilate sunt prezente numeroase mucegaiuri: *Caldosporium spp.*, *Aspergillus niger, A. flavus, Penicillinum spp.* Pentru a reduce contaminarea, pereţii şi tavanul trebuie să fie netezi, impermeabili şi lavabili; aceste condiţii sunt întrunite dacă pereţii sunt protejaţi cu folii de plastic. În zonele cu umiditate ridicată, este indicat acoperişul de cărămidă glazurată sau ţiglă; dacă se utilizează aburi, încăperea trebuie să prezinte în tavan ventilatoare.

Pentru menţinerea curăţeniei, cablurile electrice şi diferitele conducte trebuie instalate adânc în cavităţile pereţilor, care să permită întreţinerea lor, dar să nu poată colecta praful. Toate conductele care trec prin tavan trebuie să aibă suprafaţa acoperită.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pardoseala şi canalizările

Pentru a reduce contaminarea microbiană, pardoselile trebuie să fie impermeabile, uşor de spălat, cu suprafaţă plană. În anumite zone este necesar ca pardoseala să fie înclinată spre canalizare, cu un unghi care să nu permită formarea peliculelor de apă. Limita dintre pereţi şi pardoseală trebuie să fie etanşă. Podeaua este confecţionată din materiale adecvate scopului în care este utilizată încăperea; în zonele unde spălarea este necesară în mod curent sunt indicate gresia, mozaicul, suprafeţele polizate. Dacă se folosesc soluţii alcaline sau acide, pardoseala trebuie să fie compactă, deoarece pot apare pori în care de adăpostesc microorganisme.

Când sunt necesare gurile de canalizare, acestea trebuie să fie închise şi uşor de curăţat.

Conectarea la canalizare trebuie făcută în afara zonei unde se produc preparatele susceptibile de a fi contaminate, iar în zonele aseptice trebuie eliminată.

Dacă acest lucru este posibil, trebuie acoperite cu trape, prevăzute cu dispozitive de sterilizare prin căldură.

Uşile, ferestrele şi garniturile

Pentru a evita pătrunderea prafului, ramele, uşile şi ferestrele trebuie să fie fixate etanş în pereţi. Uşile trebuie să fie compacte pentru a diminua pătrunderea microorganismelor. Ideal ar fi ca ferestrele, în zonele de producţie să nu fie utilizate pentru ventilaţie, ci doar pentru iluminat. În zonele de lucru aseptic trebuie să existe un sistem de control adecvat al aerului.

În zonele de producţie conductele trebuie protejate cu materiale care să prevină formarea condensului şi posibila contaminare a produselor prin căderea acestuia. Conductele de material inoxidabil sunt mai puţin adecvate ca suport pentru creşterea microbiană, dar conductele izolate termic dacă nu sunt dezinfectate, permit creşterea mucegaiurilor.

Echipamentul

Toate piesele echipamentului de producţie şi ambalare a produselor farmaceutice au suprafeţe netede care servesc drept suport pentru creşterea microorganismelor şi trebuie supuse unor teste permanente de supraveghere a contaminării. Tipul de contaminare şi gradul de creştere a microorganismelor depinde de nutrienţii disponibili, de condiţiile de mediu (temperatură, pH).

Riscul colonizării microbiene poate fi diminuat dacă sunt respectate următoarele aspecte:

- Toate echipamentele trebuie să fie uşor demontabile şi curăţate.
- Suprafeţele care vin în contact cu produsul, trebuie să fie netede, continui fără cavităţi, fără margini în relief, cu zone de îmbinare acoperite.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Suprafețele de contact trebuie examinate curent, mai ales cele ale echipamentului pentru izolația termică, recipientele cu pereți dubli; orice fisură sau şurub de pe suprafață care nu poate fi curățat iar agenții de sterilizare nu pot pătrunde şi unde microorganismele se multiplică şi contaminează produsul.

- Instalația nu trebuie să posede şuruburi interioare iar cele exterioare trebuie să fie accesibile curățării.
- Sistemele de cuplare a țevilor şi valvelor trebuie să fie uşor detaşate şi curățate.
- Dispozitivele de agitare trebuie să fie de preferință dintr-o singură piesă, uşor de curățat.
- Valvele trebuie să aibă o formă care să permită contactul tuturor părților cu agenții de curățare. Pentru lucrul aseptic sunt avantajoase valvele dotate cu bariere pentru abur. Dacă se utilizează valve cu diafragmă, aceasta trebuie examinată permanent.
- Dacă se utilizează o instalație de evacuare cu vid pentru a scoate aerul sau aburul din vas, este necesară curățarea şi dezinfectarea periodică a sistemului pentru a preveni ca depozitarea reziduurilor aspirate să formeze un suport pentru creşterea microbiană şi reîntoarcerea lor în recipient unde contaminează produsul. Dacă aerul se reîntoarce în vas, trebuie trecut printr-un filtru sterilizant.
- Dacă se utilizează filtre sau saci filtranți din pânză sau hârtie trebuie curățați şi sterilizați permanent pentru a preveni creşterea mucegaiurilor (*Cladosporium spp., Aureobasidium pullulans*), care metabolizează celuloza.

Conductele

Conductele sunt confecționate din oțel inoxidabil, sticlă sau material plastic. Secțiunea lor internă permite spălarea şi sterilizarea pe loc, cu o viteză a fluxului agenților de curățare şi sterilizare de peste 1,5m/s. În cazul conductelor de plastic, garniturile de la îmbinări pot constitui zone unde microorganismele sunt protejate de acțiunea agenților de curățare şi sterilizare. Sterilizarea "pe loc" este utilizată şi pentru schimbătoarele de căldură plane sau tubulare, pompe şi omogenizatoare, valvele şi piesele de conexiune a valvelor sunt curățate manual; tancurile şi vasele de reacție sunt curățate şi sterilizate automat. Curățarea lor se face cu diferiți agenți: acizi, baze, detergenți anionici şi cationici. Aceşti agenți trebuie să întrunească o serie de calități:

- să acționeze asupra suprafețelor fără a produce coroziune;
- să elimine produsul fără a lăsa reziduuri;
- să fie compatibili cu apa.

Dezinfecția şi sterilizarea echipamentelor de producție se face prin căldură, sau/şi prin metode chimice.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tancurile şi vasele de reacţie sunt sterilizate cu aburi sub presiune, iar piesele mici ale instalaţiei, prin autoclavare; este esenţial ca aburul să aibă acces în toate zonele. Echipamentul utilizat pentru producerea pulberilor este sterilizat prin căldură.

Dezinfecţia chimică se face în mod obişnuit cu hipoclorit de sodiu, compuşi de amoniu quaternar (0,1 – 0,2%), etanol în apă 70% (v/v), soluţie de formaldehidă 1% (v/v).

Dezinfecţia se face prin scufundarea totală a obiectelor mici sau prin pulverizarea suprafeţelor interne ale echipamentelor mari. Îndepărtarea completă a resturilor de dezinfectant chimic este foarte importantă pentru procesele de fermentaţie, deoarece reziduurile afectează microorganismele biosintetizante.

Verificarea prezenţei microorganismelor se face prin inocularea unei plăci cu agar nutritiv a apei finale de clătire sau prin testul tamponului de vată steril sau de alginat de calciu. Tamponul de alginat de calciu se utilizează asociat cu un diluent care conţine 1%, hexametafosfat de sodiu care se dizolvă în diluent şi eliberează microorganismele prelevate de pe echipament; evaluarea microorganismelor se face prin etalarea diluentului în plăci cu agar nutritiv. Tamponul se utilizează pentru verificarea prezenţei microorganismelor pe elementele incurbate ale instalaţiei, conducte, orificii, valve, piese de racord, dar dacă nu se utilizează cantităţi măsurate, rezultatele nu pot fi exprimate cantitativ. Evaluările cantitative se fac prin presarea agarului nutritiv dintr-o placă Petri sau o placă de contact, pe o suprafaţă plană. După incubare, placa Petri sau placa de contact, cu agar, reproduc contaminarea suprafeţei testate.

Bibliografie

Confesson MA, Galtier H. *Etude des cartouches filtrantes monobloc 0,2µm pour production d'eau sterile.* Le Pharmacien Hospitalier, 107:7-21, 1991.

Favero MS, McDade JJ, Robertson JA, Hoffman RV, Edward RW. *Microbiological Sampling of surfaces.* J Appl Bacterial; 31:336-343, 1968.

Good Manufacturing Practices for Drug Manufactures and Importers. Cat no H42 – 21 – 1982. Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, Otawa, ON, Canada.

Hugo WB, Russell AD. *Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry.* In: Pharmaceutical Microbiology, ed. s Hugo WB and Russell AD, sixth edn, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 339-354, 1998.

Keyworth N, Millar MR, Holland KT. *Swab-wash method for quantitation of cutaneous microflora.* J Clin Microbial; 28: 941-933, 1990.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Nishannon A, Pokja MS. *Comparative studies of microbial contamination of surfaces by the contact plate and Swab methods*, J Appl Bacterial, 42:56-63, 1977.

Shaw CM, Smith JA, McBride ME, Duncan WC. *An evaluation of tehniques for sampling skin flora.* J Invest Dermatol; 54: 160-163, 1970.

Staal EM, Noordzji AC. *A new method for the quantitative determination of micro-organisms on human skin.* J Sc Cosmet Chem; 29: 607-615, 1970.

Stockdale D. *Clean rooms for aseptic Pharmaceutical manufacturing.* In: Aseptic Pharmaceutical Manufacturing Eds. Olson WP and Groves MJ. Interpharm Press Inc. USA; 151-175, 1990.

Wegal S. *Short time sterilisation of glass material under ultraclean conditions.* Bull Parent Drug Assoc, 28(4): 122, 1974.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

19

Contaminarea microbiologică şi prezervarea produselor farmaceutice

Contaminarea microbiologică

Supravieţuirea microorganismelor în procesul de fabricaţie sau pătrunderea lor în produse pe durata stocării sau utilizării lor, determină contaminarea formelor farmaceutice cu bacterii, fungi şi drojdii.

Dintre microorganisme, mucegaiurile (*Mucor spp., Penicillium spp.*) levurile, bacteriile (*Bacillus subtilis, Aerobacter spp., Escherichia coli, Staphylococcus spp*) se dezvoltă în produsele medicamentoase şi modifică caracterele organoleptice şi fizice ale acestora. Creşterea şi multiplicarea microorganismelor este condiţionată de conţinutul în apă, surse de carbon şi azot, prezenţa aerului, de temperatura favorabilă (20-40^{0}C).

Contaminarea microbiologică presupune:

- Supravieţuirea, în număr mic, a microorganismelor patogene sau în cantităţi mari a patogenilor oportunişti;
- Prezenţa metaboliţilor microbieni toxici;
- Creşterea microbiană asociată cu degradarea fizico-chimică a produsului farmaceutic.

Infecţia indusă prin contaminarea produselor farmaceutice

Deşi patogenii umani sunt mai puţin implicaţi în contaminarea produselor farmaceutice, prezenţa lor trebuie urmărită cu atenţie. Infecţii cu *Salmonella spp.* pot fi cauzate de contaminarea tabletelor; drojdiile pot fi prezente în capsule, când în compoziţia lor intră, în cantităţi mici, pancreatina, extract de tiroidă, pulberi vegetale. Epidemii de holeră, în Africa de Sud au fost cauzate de administrarea unor forme farmaceutice lichide preparate cu apă contaminată. Numeroase specii saprofite şi contaminanţi oportunişti nepretenţioşi nutritiv, cu patogenitate limitată pentru indivizii sănătoşi, se multiplică în produsele farmaceutice şi pot contamina pacienţii imunocompromişi. Corneea intactă este rezistentă la infecţie, dar când este lezată, rezistenţa faţă de

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pseudomonas, prezent în unele preparate oftalmice contaminate cu această bacterie, scade. *Pseudomonas* contaminează şi soluţiile aseptice şi contaminarea tegumentului pacienţilor cu arsuri, duce la compromiterea grefelor de piele şi adesea la moarte prin septicemie cu Gram negativi. Eczemele şi infecţiile respiratorii la nou născuţi pot fi cauzate de unguentele contaminate cu bacterii Gram negative.

Preparatele orale şi suspensiile antiacide în care s-au multiplicat bacteriile Gram negative, administrate pacienţilor imunocompromişi, au consecinţe grave. Soluţiile administrate intravenos, contaminate cu *Candida spp.* produc septicemii mortale la pacienţii cu transplant, care primesc terapie imunosupresivă.

Utilizarea unor fluide sau ţesuturi umane contaminate, care intră în unele produse farmaceutice poate cauza infecţii virale fatale. Sunt cunoscute infecţii cu virusul imunodeficienţei umane (HIV) la pacienţi hemofilici trataţi cu sânge uman contaminat şi infecţii Creutzfeld – Jakob, în urma administrării hormonului de creştere obţinut din glanda pituitară a unor indivizi infectaţi.

Endotoxinele bacteriene (lipopolizaharidele membranei externe) rămân active în produse, chiar după moartea bacteriilor prin sterilizare cu vapori de apă sub presiune. Deşi sunt inactive când sunt administrate oral, endotoxinele, ajunse în sânge prin lichide perfuzabile contaminate sau prin soluţiile de dializă contaminate, produc chiar dacă sunt în cantităţi foarte mici, şoc endotoxinic, adesea fatal.

Produsele farmaceutice sunt mai rar contaminate cu toxine bacteriene; totuşi în numeroase produse vegetale a fost identificată aflatoxina produsă de *Aspergillus spp.*

Degradarea fizico-chimică a produselor farmaceutice

Microorganismele contribuie în cea mai mare parte la procesul circuitului materiei organice în natură, prin diferite mecanisme de degradare. Asocierile naturale de microorganisme acţionează în cooperare mult mai eficient decât speciile individuale; substratul atacat iniţial de un grup devine receptiv la acţiunea altor grupe de microorganisme.

Sub presiunea selectivă a mediului au apărut noi căi de degradare a unor produse chimice sintetice. Rata de degradare a compuşilor eliberaţi în mediu variază mult, de la ore (fenolul) la luni (detergenţi "tari") şi ani (pesticide halogenate).

Rata de degradare a compuşilor chimici depinde de: structura chimică, proprietăţile fizico-chimice ale unui anumit mediu, tipul şi cantitatea microorganismelor prezente; de posibilitatea ca metaboliţii produşi să fie utilizaţi ca surse de energie şi precursori pentru biosinteza compuşilor celulari.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Preparatele farmaceutice pot fi considerate ca fiind micromedii şi receptivitatea la atacul microbian este asigurată de criterii ecologice convenţionale. Numeroase ingrediente naturale mult mai sensibile la atac şi unii compuşi sintetici (cum ar fi surfactanţii) sunt astfel structuraţi încât să fie rapid degradaţi după eliberarea lor în mediu. Extractele brute de origine vegetală sau animală, încorporate în diverse preparate farmaceutice, servesc ca sursă nutritivă pentru microorganisme.

Ingrediente farmaceutice receptive la atacul microbian

Agenţii activi de suprafaţă. Surfactanţii anionici (metalele alcaline şi săpunurile aminice ale acizilor graşi) sunt în general stabile, datorită pH-ului uşor alcalin al formulărilor, deşi se degradează rapid prin diluare în canalizare. Alchil şi alchilbenzen sulfonele şi sulfat-esterii sunt metabolizaţi prin ω - oxidare la nivelul grupurilor metil terminale urmată de β - oxidarea secvenţională a lanţurilor alchil şi ruperea nucleului aromatic. Prezenţa catenelor laterale necesită procese α - oxidative suplimentare. Resturile de sulfon şi sulfonat esteri sunt transformate în sulfat.

Surfactanţii neionici sunt metabolizaţi rapid de numeroase microorganisme. Clivarea lipolitică a acizilor graşi din esterii de sorbitan, a polisorbaţilor şi a esterilor de sucrosă sunt urmate adesea de degradarea nucleului ciclic, cu formarea de molecule mici, utilizate pentru creşterea microorganismelor.

Surfactanţii amfolitici, pe bază de fosfatide, betaine şi aminoacizi alchilamino-substituiţi, sunt degradaţi, în canalizare, numai în diluţii mari.

Pseudomonadele cresc bine în soluţiile antiseptice pe bază de amoniu quaternar.

Polimerii organici. Sub acţiunea exoenzimelor, numeroşi agenţi de aglutinare şi suspendare utilizaţi în farmacie sunt depolimerizaţi în fragmente nutritive şi monomeri. Substraturile asupra cărora acţionează enzimele extracelulare sunt: amidonul (amilazele), pectinele (pectinazele), carboximetilceluloza (celulazele), guma arabică şi guma treagacantha (uronidaze), dextrani (dextranaze), proteine (proteaze). Agarul, care este un complex de polizaharide este un polimer relativ inert şi de aceea este utilizat ca suport de solidificare pentru mediile de cultură a microorganismelor. Polietilenglicolii cu molecula mică sunt degradaţi rapid prin oxidarea lanţurilor hidrocarburilor. Ambalajele din polimeri sintetici (nylon, polistiren, poliester) sunt foarte rezistente la acţiunea microorganismelor, deşi celofanul (o celuloză modificată) este degradat, mai ales în condiţii de umiditate.

Umectanţii. Glicerolul şi sorbitolul, substanţe cu molecula mică, incluse în numeroase produse pentru a reduce pierderile de apă, sunt rapid metabolizaţi, dacă sunt prezenţi în concentraţii mari.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Grăsimile şi uleiurile. Compuşii hidrofobi sunt intens atacaţi când sunt dispersaţi în formulări apoase (ex. emulsii de ulei în apă); acţiunea fungilor a fost remarcată în filmul de condens de pe suprafaţă uleiurilor vrac, sau când picăturile de apă au contaminat uleiul în profunzime.

Preparatele farmaceutice pe bază de emulsii de tipul ulei în apă sunt mai puţin utilizate, comparativ cu cele din industria alimentară, când acţiunea microorganismelor este favorizată de gradul mare de solubilitate a oxigenului în numeroase uleiuri.

Prin ruperea trigliceridelor se eliberează glicerol şi acizi graşi; acizii graşi trec, prin β - oxidarea lanţurilor alchil în cetone mirositoare. Pentru industria farmaceutică, contaminarea uleiurilor din tancurile de stocare este o problemă, deoarece prezenţa fungilor determină coroziunea.

*Agenţi de îndulcire, aromatizare şi colorare.*Multe zaharuri şi diverşi agenţi de îndulcire care intră în componenţa preparatelor farmaceutice sunt utilizate de microorganisme ca surse nutritive; aceşti agenţi sunt utilizaţi în concentraţii mari, în produse apoase pentru a preveni creşterea microbiană. Numeroşi agenţi coloranti (ex. tartrazina) şi aromatizanţi (apa mentolată) sunt preparaţi ca soluţii stock, dar frecvent sunt contaminate cu *Pseudomonas spp.* mai ales *P. aeruginosa.* De aceea se recomandă ca aceste soluţii stock să conţină şi agenţi de prezervare sau să fie preparate proaspăt, folosind ca diluent alcoolul, formă în care sunt mai puţin expuse contaminării.

Agenţii terapeutici. A fost demonstrat că numeroase microorganisme pot metaboliza o serie de agenţi terapeutici, acţiune care duce la diminuarea activităţii lor. Alcaloizii (morfina, stricnina, atropina), analgezice (aspirina, paracetamolul), talidomida, barbituraţii, esterii steroidici, acidul mandelic, pot fi metabolizaţi şi servesc ca surse nutritive pentru microorganisme. Semnalările privind degradarea medicamentelor sub acţiunea microorganismelor sunt numeroase. Atropina, din preparatele oftalmice este metabolizată de fungi, penicilina este inactivată de beta-lactamazele produse de numeroase specii bacteriene, steroizii din tabletele umezite şi creme sunt degradaţi de fungi, aspirina în suspensie este hidrolizată de bacteriile care produc esteraze, cloramfenicolul este inactivat de contaminanţii care elaborează acetilaze.

Prezervanţii şi dezinfectantele. Diferite specii de bacterii Gram negative pot metaboliza diverse produse prezervante şi dezinfectante când sunt în concentraţii mai mici decât cele eficiente utilizate. Flacoanele cu soluţii de amoniu quaternar pot fi contaminate cu bacterii Gram negative, mai ales *Pseudomonas cepcia, P. aeruginosa,* enterobacterii. În soluţie apoasă, sărurile de amoniu quaternar sunt la originea unor septicemii, infecţii cutanate, pulmonare, urinare (ca urmare a utilizării pentru antisepsia cutanată, pentru dezinfecţia instrumentarului medical, a unor comprese păstrate în recipiente prost dezinfectate). A fost descrisă recent o epidemie de artrită cu *Serratia*

BUMS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

marcescens la originea căreia au stat flacoanele de lidocaină şi metilprednisolon contaminate în momentul dezinfecţiei dopului cu comprese asemenea contaminate.

Pseudomonas spp. metabolizează prezervanţii pe bază de ester 4 – hidroxibenzoat din soluţiile oftalmice şi cele cu administrare orală şi produc infecţii grave.

Efectele acţiunii microorganismelor asupra produselor farmaceutice

Efectele degradării ingredientelor din produsele farmaceutice apar când multiplicarea microorganismelor depăşeşte 10^6. Creşterea şi acţiunea microorganismelor poate avea loc la suprafaţă sau în profunzimea produselor vâscoase, cum ar fi cremele. Primele semne ale contaminării sunt adesea organoleptice, asociate cu mirosul şi gustul neplăcut al unor metaboliţi cum ar fi acizi graşi "acri", amine cu miros de peşte, de ou stricat sau de pământ. Produsele încep să se coloreze cu pigmenţi microbieni de diferite nuanţe. Agenţii de aglutinare şi suspendare (tragacantha, acacia, carboximetilceluloza) pot fi depolimerizaţi; vâscozitatea dispare iar ingredientele aflate în suspensie, sedimentează. Polimerizarea zaharurilor şi a surfactanţilor pot genera o consistenţă vâscoasă a siropurilor, şampoanelor şi cremelor, iar creşterea fungilor în creme produce o textură "nisipoasă".

Modificările pH-ului produsului depind de produşii alcalini sau acizi care se eliberează şi înlesnesc astfel atacul secundar cu microorganisme care anterior au fost inhibate de valoarea iniţială a pH-ului.

Metaboliţii gazoşi produc bule în preparatele vâscoase. Când sunt atacate produse pe bază de emulsii, contaminarea este progresivă şi masivă. Metabolizarea surfactanţilor reduce stabilitatea şi accelerează "decantarea" globulelor de ulei. Eliberarea lipolitică a acizilor graşi sub formă de uleiuri scade pH-ul şi favorizează concreşterea globulelor de ulei şi "cracarea" emulsiei. Acizii graşi şi produşii lor rezultaţi prin oxidarea cetonică, produc un miros şi gust neplăcut; în produs pot apare bule vizibile şi culoarea se modifică.

Factori care influenţează contaminarea produselor farmaceutice

Cunoscând influenţa factorilor fizici şi chimici asupra creşterii microorganismelor, în procesul preparării şi manipulării produselor farmaceutice se pot crea condiţii nefavorabile, care să limiteze creşterea şi contaminarea microbiană.

Tipul şi mărimea inoculului contaminant

Cunoaşterea ecologiei microorganismelor şi identificarea contaminanţilor sunt foarte utile în depistarea fazelor necorespunzătoare ale procesului de producţie.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul mic de contaminanți, care nu se pot multiplica în produs, nu pot cauza o contaminare semnificativă, dar dacă se suspectează o creştere a nivelului de contaminare trebuie luate măsuri pentru a găsi sursa microbiană. Aceste surse de contaminare pot fi:

- materiile prime contaminate în mod neobişnuit;
- nerespectarea protocolului de curățare a instalației;
- cantități mari de microorganisme detaşate în conductele de aprovizionare;
- modificarea procedeelor de fabricație fără a urmări creşterea contaminanților pe parcursul operațiunilor modificate;
- efectuarea unor lucrări de demontare în apropierea sectoarelor de producție;
- manevrarea greşită a produsului în cursul administrării.

Mărimea inoculului nu este totuşi un indicator real al potențialului de contaminare. Prezența pseudomonadelor în număr mic, în soluțiile prost prezervate reprezintă un risc mult mai mare decât tabletele care conțin un număr mare de spori fungici sau bacterieni.

În cazul contaminanților agresivi, este nevoie de o perioadă apreciabilă de lag înaintea contaminării semnificative a produsului farmaceutic, a cărei durată descreşte invers proporțional cu creşterea masei contaminante. Este necesară controlarea produselor preparate extemporaneu, la cel puțin două săptămâni.

Izolarea unui anumit microorganism, dintr-un produs contaminat masiv, nu trebuie să ducă la concluzia să acesta este inițiatorul contaminării. Frecvent este un contaminant oportunist secundar a cărui creştere a fost posibilă prin modificarea condițiilor fizico-chimice de către un contaminant primar.

Factorii nutritivi

Majoritatea microorganismelor saprofite au necesități nutriționale simple şi capacitatea de a se adapta metabolic, aspecte care le permit utilizarea ca substrate pentru creştere şi biosinteze a numeroşi componenți din preparatele farmaceutice. Utilizarea extractelor vegetale şi animale brute, în diferite preparate, reprezintă o sursă nutritivă adițională din mediu. Deseori apa demineralizată conține suficienți nutrienți pentru a permite creşterea unor bacterii Gram negative cum ar fi *Pseudomonas spp.*

Numeroşi patogeni au nevoie pentru creştere de factori specifici, prezenți în țesuturile pe care de infectează şi care normal, nu sunt prezenți în preparatele medicamentoase. Dacă sunt totuşi prezenți în aceste produse, supraviețuiesc un timp, fără a se multiplica.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conținutul în apă. Activitatea apei

Pentru a se dezvolta, microorganismele necesită cantități apreciabile de apă. Totuşi, în numeroase soluții, cum ar fi siropurile, creşterea microorganismelor este dificilă, deoarece moleculele de apă sunt legate de numărul mare de molecule de zaharuri şi alte ingrediente prin legături de hidrogen. Evaluarea apei nelegate, care poate permite creşterea unor contaminanți se face prin măsurarea activității apei (Aw, water activity) după formula:

Aw = presiunea vaporilor din produs ÷presiunea vaporilor de apă în condiții similare

Exceptând bacteriile halofile, majoritatea microorganismelor cresc mai bine în soluții diluate (valori mari ale Aw) şi când concentrațiile cresc (valori mici ale Aw) rata de creştere se reduce la minimum, atingându-se valoarea inhibitorie a Aw. Valorile limită ale Aw pentru difeirte specii sunt: bacterii Gram negative: 0,95; stafilococi, micrococi, lactobacili: 0,9; drojdii: 0,88. Drojdiile osmotolerante contaminează siropurile la un nivel al Aw mai mic de 0,73, iar fungii (*Aspergillus glaucus*) la valoare < 0,61.

Valoarea Aw în preparatele apoase poate fi diminuată pentru a creşte rezistența la acțiunea microorganismelor prin adăugarea unor concentrații mari de zahăr sau polietilenglicoli. Zahărul din produsele farmaceutice are tendința de a fi înlocuit cu sorbitolul şi fructoza care nu favorizează apariția cariilor. Sarea folosită în conservarea cărnii, nu este admisă în preparatele farmaceutice. Activitatea apei poate fi diminuată prin uscare şi pentru preparatele higroscopice este necesară ambalarea adecvată pentru a preveni adsorbția apei şi favorizarea creşterii microbiene. Tabletele protejate de film sunt bine menținute în timpul păstrării într-un climat umed; ambalarea în folii este eficientă, dar costisitoare.

Pelicula de apă de condens care se formează la suprafața produselor "uscate" (ex. tablete) sau a uleiurilor păstrate în atmosferă cu fluctuații de temperatură asigură valori ale Aw care favorizează creşterea fungilor. Pe suprafața produselor vâscoase (siropuri, creme) se formează filme apoase care permit contaminarea cu drojdii şi mucegaiuri.

Potențialul redox

Creşterea microorganismelor într-un mediu este influențată de balanța oxidare-reducere (potențial redox) deoarece calea respiratorie are nevoie de acceptori terminali de electroni compatibili. Ambalarea în vid sau includerea unor absorbanți de oxigen în ambalaj pentru a reduce cantitatea de oxigen, are drept scop reducerea contaminanților aerobi, dar nu elimină complet

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

contaminarea. Utilizarea bioxidului de carbon sub presiune pentru a conserva băuturile este bazată mai mult pe acțiunea specific antimicrobiană a acidului carbonic decât pe eliminarea oxigenului. Unele produse alimentare pe bază de carne, vâscoase, cu un potențial redox suficient de scăzut, permit creşterea unor bacterii anaerobe (*Clostridium spp.*) periculoase, dar aceste aspecte nu sunt valabile şi pentru produsele farmaceutice.

Temperatura de păstrare

Contaminarea produselor farmaceutice se realizează în intervalul de temperatură de -20 - 60^0C. Temperatura de stocare poate determina contaminarea selectivă cu anumite tipuri de microrganisme. Unele produse alimentare şi materii prime farmaceutice sunt păstrate la congelator, pentru perioade mai îndelungate, la temperatura de -20^0 C sau mai scăzută.

Siropurile şi soluțiile oftalmice sunt însoțite de instrucțiuni privind "păstrarea" în locuri reci (frigider la 8 – 12^0 C) pentru a reduce riscul contaminării înainte de data expirării. Apa pentru injecții, conform recomandărilor din farmacopee, trebuie păstrată la 80^0 C sau mai mult, după distilare şi înainte de a fi ambalată şi sterilizată, pentru a preveni posibila creştere a bacteriilor Gram negative şi eliberarea de endotoxine.

pH-ul

Majoritatea bacteriilor se dezvoltă în medii neutre sau uşor alcaline (pH = 7,5). Valorile extreme de pH inhibă creşterea microbiană; mucegaiurile cresc adesea în acid clorhidric diluat şi de aceea este necesară prezervarea standardelor analitice de acid.În emulsiile pe bază de săpun,cu pH8, creşterea este rară. Produsele cu pH mic, cum ar fi siropurile de citrice (pH = 3 – 4), fac posibilă creşterea mucegaiurilor. Drojdiile metabolizează acizii organici şi cresc valorile pH-ului, favorizând creşterea secundară a bacteriilor. Ajustarea pH-ului, practicată pentru conservarea produselor alimentare, nu este admisă în cazul produselor farmaceutice.

Ambalajul

Ambalajul este important pentru prevenirea contaminării microbiologice, în cursul stocării şi utilizării produselor farmaceutice. Design-ul containerelor pentru ambalarea produselor farmaceutice trebuie să prevină contaminarea, mai ales a formelor parenterale.

Permeabilitatea ambalajului pentru microorganisme se determină prin scufundarea recipientului care conține produsul medicamentos într-o cuvă care conține bulion nutritiv inoculat

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu o suspensie de *Bacillus prodigiosus*. După incubare, 8 ore la temperatura ambiantă se verifică conținutul recipientului, care nu trebuie să fie contaminat.

Flacoanele multidoze injectabile sunt sigilate cu dop de cauciuc. Borcanele pentru cremă, care se contaminau ușor de la degete, au fost înlocuite cu tuburi flexibile, închise cu dop. Cutiile de carton și etichetele pot fi substrate, în condiții de umiditate, pentru microorganisme și deseori este necesară încorporarea de prezervanți pentru a reduce riscul distrugerii lor.

Protecția microorganismelor în interiorul produselor farmaceutice

Supraviețuirea microorganismelor în medii speciale este influențată de prezența unor materiale relativ inerte. În prezența unor polimeri (amidon, acacia, gelatină) unele microorganisme sunt mai rezistente la căldură sau uscăciune. Adsorbția în acești compuși naturali le conferă protecție.

Utilizarea agenților antimicrobienei în prezervarea produselor farmaceutice

Agenții antimicrobieni cu rol de prezervanți sunt incluși în preparatele farmaceutice pentru a reduce riscul contaminării și care pot omorâ contaminanții rămași în produsele nesterile, după procesul de fabricație sau care au pătruns pe durata stocării sau a utilizării.

Un conservant ideal trebuie să dețină o serie de proprietăți:

- să posede un spectru larg de acțiune;
- să omoare rapid contaminanții microbieni care au pătruns în produs;
- să nu fie toxic sau iritant pentru pacient;
- să fie stabil fizic, chimic, microbiologic pe toată durata de viață a produsului și într-o gamă largă de valori ale pH-ului și temperaturii;
- să reacționeze într-o gamă largă de valori ale pH-ului și temperaturii;
- să reacționeze selectiv cu contaminanții și nu cu ingredientele din produs;
- să aibă un gust și un miros acceptabil în concentrația utilizată.

Totuși cei mai activi agenți antimicrobieni au acțiune neselectivă și interacționează atât cu ingredientele din produs, cu pacientul, cât și cu microorganismele.

Omorârea rapidă a contaminanților este posibilă doar în soluțiile apoase cum ar fi soluțiile oftalmice. În sistemele fizico-chimice complexe, cum ar fi emulsiile sau cremele, conservanții inhibă doar creșterea și după o perioadă rata de omorâre este atinsă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Adiționarea de conservanți trebuie indicată pe etichetă, cu concentrația pe unitatea de volum sau masă (Tabel 19.1).

Tabel 19.1 Conservanți utilizați în diverse forme farmaceutice

Preparat farmaceutic	Conservant	Concentrație uzuală % m/v	Particularități de utilizare
Soluții injectabile	Alcool benzilic	0,5 - 10	Hidrosolubil, volatil
	Butilperaben Metilparaben Propilparaben	0,015 0,01 - 0,18 0,005 – 0,035	Acizi puțin solubili în apă, săruri de sodiu solubile active la pH cu valori acide și alcaline
	Fenol Cresol Nitrat de fenilmercur	0,5 0,3 0,001	Inactivat de materii organice Activ la pH>7
Colire	Clorhexidina Clorura de benzalconiu Nitrat sau acetat de fenilmercur	0,01 0,01 0,001	Hidrosolubil, activitatea, maximă la pH 7-8 Potențat de 0,01-0,1% EDTA, inactivat de săpunuri anionice Activ la pH>7
Pomezi	Alcool benzilic Etanol Parabene Propilen glicol Piritiona (sare de zinc)	0,5 – 3 20 0,1 15 – 30 0,025 – 0,1	Interacționează cu materialele plastice Volatil, destabilizează emulsiile și suspensiile la concentrații mari Inactivați de surfactanți mai puțin volatili și mai compatibil decât etanolul Incompatibilă cu agenți chelatori
Lichide (soluții, suspensii, emulsii) administrate pe cale orală	Acid benzoic Acid dihidroacetic Acid sorbic Metil paraben Etanol Sucroza Polioli (sorbital, glicerol)	0,1 0,5 – 0,2 0,1 12 - 20 > 85 10 - 20	Activ la pH<4 (formă neionizată) Activ la pH<7, neutralizat de surfactanți neionici Activ la pH<4 (forma neionizată) sensibil la oxidare Activ la pH alcalin și acid Volatil în concentrații mari, destabilizează emulsiile și suspensiile
Capsule	Metilparaben – propilparaben (4/1)	0,2	
Topice pentru administrarea nazală, auriculară	Clorura de benzalconiu	0,004 – 0,02	Potențată de 001 – 0,1% EDTA; inactivată de săpunuri și compuși anionici

Acidul boric și sărurile acestuia se utilizează pentru preparatele oftalmice; clorura de benzalkoniu, clorura de cetilpiridina, clorhexidina, acidul propionic și sărurile acestuia, acidul dihidroacetic (activ la pH acid) în formulele topice. Glucoza asociată cu poliolii (glicerol, sorbitol, propilenglicol, polietilenglicol) este încorporată in lichidele buvabile.

Efectele agenților de prezervare sunt amplificate prin asocieri sinergice:

- alcoolul fenil-etilic cu compușii de amoniu quaternar, parabene, organomercuriale;
- EDTA cu compuși de amoniu quateranr, clorhexidina, parabene și acid sorbic;
- propilen glicolul cu parabene și sorbați.

Efectele concentrației agentului de conservare, temperaturii și mărimii inoculului

Eficiența agenților conservanți variază exponențial cu concentrația, limitele de variabilitate fiind în funcție de tipul de agent. De exemplu, reducerea la jumătate a concentrației fenolului duce la reducerea de 64 de ori a activității; o reducere similară pentru clorhexidină, reduce puterea de omorâre doar de 4 ori. Modificările temperaturii produsului, afectează eficiența diferitelor prezervante asupra unor anumite grupe de microorganisme. Scăderea temperaturii de la 30^0 C la 20^0 C, determină micșorarea puterii de omorâte asupra *Escherichia coli* de 5 ori și respectiv de 45 ori pentru fenol și etanol. Când aceşti doi factori variază concomitent efectele sunt mai complexe. De exemplu, dacă o soluție de clorocrezol omoară complet o suspensie de *E. coli* în 10 minute la 30^0 C, același efect se obține înaproximativ 90 minute la 20^0 C.

Moleculele de conservant sunt utilizate pentru a inactiva și microorganismele care sunt introduse pe parcursul utilizării; aceasta duce la o diminuare exponențială a eficienței conservantului remanent.

Factorii care afectează disponibilitatea agenților conservanți

Numeroși agenți de conservare interacționează în soluție cu ingredientele din produsele farmaceutice, astfel că numai o mică parte din prezervantul prezent este disponibil pentru a inactiva cantități mici de microorganisme; rata de omorâre este mai redusă decât puterea găsită pentru soluțiile apoase simple. Este admis că în soluțiile foarte concentrate, și cu valoare Aw redusă, eficiența prezervantelor este diminuată, iar la valori foarte mici ale Aw, devin inactive. Introducerea agenților de conservare în produse cu valoare Aw foarte mică (tablete, capsule) nu este indicată.

Efectul pH –ului

Activitatea conservanților slab acizi este asigurată de moleculele neionizate și eficiența este semnificativă când pH-ul este mic. Acidul benzoic și acidul ascorbic sunt mai puțin utilizați la pH-uri mai mari de 5; esterii de hidrobenzoat cu gruparea esterică neionizabilă au efect protector moderat la valori neutre de pH.

Conservanții pe bază de amoniu quaternar și clorhexidina sunt activi probabil prin cationii conținuți și sunt eficienți în produsele cu pH neutru.

Valoarea pH-ului produsului influențează direct sensibilitatea microorganismelor față de conservanți.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru preparatele apoase pH-ul final este rezultatul dintre pH-ul principiului activ şi al conservantului.

In cazul sistemelor dispersate de tip emulsie în care microorganismele proliferează atât în faza apoasă cât şi în faza lipofilă, activitatea antimicrobiană eficientă se obţine prin asocierea a doi prezervanţi cu solubilităţi diferite (ex. un ester metilic hidrofil şi un ester propilic, lipofil al acidului para-hidroxibenzioc, care acţionează asupra microorganismelor prezente în cele două faze. Coeficienţii de partaj pentru o serie de prezervanţi sunt consemnaţi în Tabelul 19.2, pentru diverse sisteme apă/ulei.

Tabel 19.2 Coeficienţii de partaj K (concentraţia în ulei/concentraţia în apă)

Agent conservant	K	Ulei
Alcool benzilic	1,3	Ulei de arahide
	0,2	Parafină lichidă
Clorhexidina	0,075	Parafină lichidă
	0,04	Ulei de arahide
Metilparaben	0,03	Parafină lichidă
	7	Lanolină
Propilparaben	0,5	Parafină lichidă
	80	Ulei de arahide

Efectul containerului sau ambalajului

Disponibilitatea conservantului este redusă semnificativ prin interacţiunea cu materialul ambalajului. Conservanţii fenolici, de exemplu, pătrund în dopurile de cauciuc ale formelor injectabile multidoze sau ale flacoanelor cu soluţii oftalmice; de asemenea mai interacţionează cu tuburile flexibile din material plastic utilizate la ambalarea cremelor. Nivelurile conservanţilor de amoniu quaternar din produse sunt diminuate semnificativ prin adsorbţia pe suprafaţa recipientelor de sticlă şi plastic. Conservanţii volatili, cum ar fi cloroformul sunt repede pierduţi prin deschiderea şi închiderea repetată a containerelor, de aceea utilizarea acestuia este limitată la conservarea produselor închise ermetic pe durata stocării, cu utilizare rapidă după deschidere.

Volatilitatea anumitor prezervanţi (alcool benzilic, clorobutanol) determină diminuarea activităţii şi mirosul neplăcut al produsului.

Solubilitatea agentului conservant în compuşii preparatului este un aspect esenţial; fracţiunea activă liberă depinde de coeficientul de partaj pentru diferiţi constituenţi (hidrofili, lipofili). Acest coeficient depinde la rândul său de pH şi temperatură.

Interacţiunile cu excipienţii din preparat şi cu materialele de condiţionare duc la diminuarea activităţii conservanţilor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Agenții activi de suprafață interacționează puternic ducând la solubilizarea și diminuarea fracțiunii libere active a antisepticelor: polisorbatul 80 în proporție de 5% inhibă 80% din metilparaben. Rețeaua de surfactiv poate constitui un rezervor care eliberează lent agentul conservant. Efectu inhibitor manifestă și polimerii hidrofili (Tabel 19.3). Interacțiunile sunt cunoscute și aplicate pentru neutralizarea agenților conservanți în testele de eficiență in vitro (Tabel 19.4).

Caolinul (din componența suspensiilor) diminuează activitatea clorurii de benzalconiu. Materialele plastice și elastomerii adsorb agenții conservanți în cantități neglijabile. Clorcresolul se repartizează în raport de 85/15 între elastomeri și apă.

Tabel 19.3 Interacțiunile parabenelor cu macromoleculele și agenții activi de suprafață

Macomolecule	**Parahidroxibenzoat de metil**		**Parahidroxibenzoat de propil**	
	% liber	% legat	% liber	% legat
Gelatina	92	8	89	11
Metilceluloza	91	9	87	13
Polietilenglicol	84	16	81	19
Polivinilpirolidona	78	22	64	36
Surfactanți				
Monostearat de polioxietilenglicol	55	45	16	84
Monolaurat de sorbitan polioxietilen	43	57	14	86
Monolaurat de sorbitan polioxietilen	43	57	10	90

Tabel 19.4 Agenți neutralizanți ai prezervanților

Neutralizant	Prezervant
Polisorbat 80	Paraben, fenol și derivați, amoniu quateranar, clorhexidina, acid sorbic, alcooli
Tiosulfat de sodiu	Ioduri, cloruri, hipoclorit
Lecitina	Amoniu quaternar, clorhexidina, fenoli, parabene
L – cisteină, tioglicolat și derivați sulfuroși	Derivați de mercur

Asigurarea calității și controlul riscului de contaminarea a produselor farmaceutice

Asigurarea calității include toate procedurile necesare obținerii unor produse conforme descrierilor privind calitatea. Acestea includ etapele intermediare și forma finală, practica bună de fabricație (Good pharmaceutical manufacturing practice – GPMP).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Asigurarea calității în cursul obținerii și în forma finală

Riscul contaminării microbiene care apare în cursul fabricării, păstrării și utilizării, poate fi eliminat prin prezentarea produselor în doze mici, sterile, în ambalaje ermetice. Această strategie este foarte costisitoare, și se aplică, în cazul produselor parenterale, unde riscul infecției cu contaminanți este mare; la aceasta se adaugă și riscul toxicității agenților de prezervare.

Soluțiile oftalmice pentru tratamentul ambulator, au risc mai redus și sunt acceptate produsele sterile multidoze care conțin agenți de prezervare cu rol în combaterea unei eventuale contaminări; produsele sterile în doză unică sunt de preferat atunci când se utilizează în spital. Administrarea orală și locală prezintă un risc mic de contaminare și trebuie controlat conținutul microbian pe parcursul etapelor de producție și protecția față de contaminarea fizico-chimică. Deoarece prezervanții antimicrobieni sunt potențial toxici, trebuie incluși numai atunci când sunt inofensivi și benefici. Stabilirea parametrilor fizico-chimici optimi, eliminarea ingredientelor cu sensibilitate deosebită, selectarea agenților prezervanți, alegerea recipientelor corespunzătoare contribuie semnificativ la stabilitatea produsului farmaceutic. Pentru produsele dozate în formă uscată, conținutul foarte scăzut de apă activă asigură protecția față de contaminarea microbiană, iar ambalajele impermeabile împiedică pătrunderea vaporilor de apă.

Practica bună de fabricație include controlul ingredientelor, a construcției instalației, procesului de producție, a curățării instalațiilor.

Este necesară eliminarea unor contaminanți din materiile prime , cum ar fi *Pseudomonas* din gelul de hidroxid de aluminiu. În cazul produselor obținute din culturi de țesuturi umane sau animale, trebuie făcute controale pentru a elimina liniile de celule contaminate cu virusuri latente. Normele oficiale recomandă utilizarea ingrtedientelor de origine bovină, obținute de la animale din zone unde encefalopatia spongiformă nu este endemică, pentru a limita riscul contaminării cu prioni.

Controlul de calitate

European Pharmacopoeia a introdus standarde microbiologice cantitative și calitative pentru formele farmaceutice nesterile, care indică nivelurile maxime admise și exclud prezența anumitor specii, în funcție de calea de administrare. Astfel, pentru formele administrate oral, este admis un număr care să nu depășească 10^3 bacterii aerobe și 10^2 fungi per gram sau cm^3 de produs și absența speciei *Escherichia coli*. Sunt acceptate și niveluri mai ridicate dacă produsul conține materii prime naturale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a reduce costurile şi a scurta perioadele de carantină, se pot utiliza metode convenţionale, automate pentru determinarea microorganismelor (impedanţa electrică, microcalorimetria, testul luciferazei). Pentru a preveni şocul endotoxinic, endotoxinele (pirogene) trebuie să fie absente sau în cantităţi extrem de mici în produsele parenterale. Odinioară, prezenţa endotoxinelor era identificată prin injectarea la iepure a produsului şi notarea răspunsului febril. Astăzi majoritatea determinărilor se fac cu testul *Limulus* în care lizatul amoebocitic din crabul *Limulus polyphemus* reacţionează cu specificitate înaltă cu lipopolizaharidele şi formează în gel o opacifiere la diluţii foarte mari. O variantă a testului utilizează un substrat cromogenic a cărui culoare este detectată, spectrofotometric. Testul pe culturi de celule se bazează pe abilitatea endotoxinelor de a induce eliberarea de citokine, care se pot evalua cantitativ.

Pentru detectarea aflatoxinei se utilizează extracţia cu solvent, adsorbţia pe coloana care conţine anticorpi specific şi detectarea complexelor formate prin expunerea la lumina ultravioletă.

Mai trebuie efectuate teste pentru semnalarea eventualei contaminări chimice a produsului. Astfel, contaminarea emulsiilor poate fi evidenţiată prin înregistrarea modificărilor de pH, vâscozitate, sedimentare.

Bibliografie

Blech MF, Hartemann P. *Les antiseptiques: familles, criteres d'efficacite et regles d'emploi.* Concours Med, 31:2505-2514, 1986.

Beannan DK. *Cosmetic preservation.* J Soc Cosmet Chem, 46:199-220, 1995.

British Pharmacopeia. Appendix XVIC: *Efficacy of Antimicrobial Preservation*, A 191-A 192, London: HMSO, 1993.

British Pharmacopeia. Appendix XVIA: *Test for Sterility*, A 180 – A184, London HMSO, 1993.

Brown P, Rohwer RG, Gajdusek D. *Sodium hydroxyde decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease virus*, N Engl J Med, 310: 727, 1982.

Cerf O, Carpentier B. *Un point critique pour la maitrise de l'hygiene: l'environnement des ateliers.* In: Microbiologie Predictive et HACCP, ed Amgar A, ASEPT Editeur, Laval, 169-180, 1992.

Chaudier-Dalage V. *Les antiseptiques. Lyon Pharmaceutique*, 45: 93-112, 1994.

Falson FR, Falson S. *Les desinfectants et les conservateurs dans l'industrie pharmaceutique.* In: Antisepsie et desinfection. Eds: Fleurette J, Frenney J, Reverdy M-E, ed ESKA, Paris, 604-613, 1995.

Popescu C, Brăileanu C. *Indreptar Farmaceutic.* Ed. Medicală, Bucureşti 53-74, 1976.

Stavri N. *Curs de Microbiologie Farmaceutică. Litografia UMF Iaşi*, 196-212, 1985.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

20

Produsele farmaceutice sterile

Soluțiile injectabile

Toate produsele injectabile trebuie obținute conform celor mai înalte standarde. Produsul trebuie să conțină un nivel minim de particule şi substanțe pirogene iar formularea şi ambalarea trebuie să asigure menținerea integrității produsului în timpul procesului de producție, să fie stabil fizic şi chimic pe durata stocării şi administrării. Stabilitatea chimică este asigurată prin includerea în formulă a unor antioxidanți şi agenți de solubilizare cum ar fi propilenglicol sau polisorbați, pentru menținerea în soluție a compuşilor slab solubili. Ambalajul trebuie să prevină pierderea apei şi a principiului activ în timpul sterilizării şi să nu permită modificarea calității microbiologice. Ambalajul nu trebuie să elibereze în produs elemente chimice din conținutul său (din cauciuc sau din policlorura de vinil).

Formularea produselor injectabile depinde de o serie de factori: solubilitatea în apă a ingredientelor active, doza utilizată, stabilitatea termică a soluției, calea de administrare, condiționarea în forme multidoze sau doză unică. Produsele injectabile administrate spinal, cum ar fi intratecal şi volumele injectabile mari sunt preparate în doză unică. Injecțiile multidoze impun încorporarea unor agenți de prezervare care să prevină contaminarea pe măsură ce se epuizează dozele. Injecțiile în doză unică sunt ambalate în fiole care conțin 1,2 sau 5 ml produs.

Anumite tipuri de injecții trebuie să fie izoosmotice cu sângele, mai ales când sunt administrate în volume mari: soluțiile hipotonice produc liza globulelor roşii şi ca urmare nu pot fi folosite. Soluțiile hipertonice pot fi folosite: acestea induc micşorarea dar nu liza hematiilor care ulterior îşi recapătă forma.

Infuziile intravenoase

Sunt soluții injectabile, cu volum mare (500 ml sau mai mult) care sunt infuzate intravenos; în mod frecvent sunt soluții izotonice de NaCl şi glucoză care se sterilizează în autoclav. Se utilizează pentru menținerea balanței electrolitice, pentru înlocuirea fluidelor extracelulare (ex. după

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

intervenţii chirurgicale sau în timpul perioadelor prelungite de pierdere a fluidelor), ca sursă suplimentară de energie (1 litru de 5% glucoză m/v = 714 kJ) şi ca vehicule pentru diverse medicamente.

Pentru preparare se utilizează apa distilată preparată proaspăt şi apirogenă, care să intrunească recomandările farmacopeelor. Farmacopeea Română X (1993) consideră apa distilată apirogenă la aproximativ 4 ore de la preparare, iar Farmacopeea Franceză X, supl. 1991, la 3 ore de la colectare. Apa distilată se contaminează uşor şi trebuie colectată în recipiente sterile, în circuit închis.

Un număr mic de infuzii intravenoase, cum ar fi cele care conţin aminoacizi sau clormetiazol sunt preparate în flacoane de sticlă închise cu dop de cauciuc şi etanşate cu buşon de aluminiu. Dopul de cauciuc nu trebuie să elibereze fragmente solubile. Flacoanele sunt sterilizate în autoclav şi este posibil ca soluţia să se contamineze înainte de a fi utilizată, prin pătrunderea microorganismelor în flacoanele care nu sunt închise etanş. Contaminarea poate avea loc chiar în timpul sterilizării, spre final când reducerea timpului de sterilizare se realizează prin pulverizarea apei pe flacoane. Dacă buşonul de aluminiu nu aderă perfect pe dopul de cauciuc, apa pătrunde între acestea şi apoi în flacon.

Numeroase infuzii sunt ambalate în containere de plastic, termorezistente, elastice, transparente şi netoxice. Dacă se utilizează un material plastic de calitate proastă este posibil să se elibereze în produs compuşi toxici, cum ar fi dietilftalat. De asemenea este posibilă pierderea apei dacă containerul nu este protejat la exterior de o ţesătură impermeabilă pentru apă.

Aditivii intravenoşi

O practică obişnuită în spital este adăugarea de medicamente în infuzii înainte sau în timpul administrării. Cei mai frecvenţi aditivi sunt: clorura de potasiu, heparina, vitamine, antibiotice. Această practică este riscantă; medicamentul poate precipita în infuzie din cauza pH-ului (ex. amfotericina), sau a prezenţei sărurilor de calciu (ex. tiopentona) sau se poate inactiva rapid (ex. ampicilina în glucoză 5% m/v). Medicamentele mai pot fi pierdute prin absorbţia în pereţii containerului: insulina este absorbită de sticlă sau de policlorura de vinil (PVC), gliceril trinitratul şi diazepamul - de PVC. Dacă adiţionarea acestor compuşi nu este făcută strict aseptic, fluidul poate fi contaminat cu microorganisme. Adiţionarea trebuie făcută în boxă cu aer laminar, de preferat în farmacii şi fluidul preparat aseptic să fie administrat în următoarele 24 ore. Aditivii pot fi adăugaţi în volume mici în infuzii, în containere de plastic, congelaţi la -20^0 C şi utilizaţi când este necesar prin decongelare cu microunde. Unele antibiotice sunt stabile timp de câteva luni la temperatura de

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

-20^0 C şi nu sunt afectate de procesul dezgheţării cu microunde. Altele însă, cum ar fi ampicilina, sunt degradate prin congelare.

Nutriţia parenterală totală utilizează amestecuri concentrate de aminoacizi, vitamine, săruri anorganice şi surse de energie (emulsii de grăsimi, carbohidraţi), pentru pacienţi care nu pot fi hrăniţi normal pe perioade îndelungate. Ingredientele necesare pentru o zi sunt preparate în farmacii în containere de plastic, în condiţii aseptice, pentru a preveni contaminarea microbiană. Aceste soluţii sunt medii care oferă condiţii bune de cultivare pentru bacterii şi mucegaiuri.

Grăsimile sunt administrate ca emulsii, ulei în apă, care conţin cantităţi mici de ulei vegetal corespunzător (ex. ulei de soia), emulsionat cu lecitină din ou şi sterilizate prin autoclavare.

Uleiurile vegetale trebuie să corespundă condiţiilor de calitate prevăzute de FR X; uleiul de soia, de floarea soarelui trebuie să fie neutralizat şi sterilizat. Dacă indicele de aciditate este ≤0,25, nu mai este necesară neutralizarea .

Soluţii injectabile în vehicul apos, în volume mici

Dozele unice, în mod obişnuit 1 – 2 ml, dar şi mai mari – 50 ml, sunt ambalate în fiole de sticlă borosilicată, plastic (polietilenă sau polipropilenă, sau mai rar, flacoane cu multidoze de 10 – 15 ml, închise cu dop de cauciuc).

Nu este indicată includerea mai multor doze în flacon deoarece există riscul contaminării prin utilizare repetată. Contaminarea poate fi prevenită prin includerea în produs a substantelor bactericide. În soluţiile injectabile care depăşesc 15 ml nu se includ substanţe bactericide.

Este total interzisă includerea prezervanţilor în formele injectabile administrate intraarterial, intracardiac, intratecal, subarahnoidal, peridural.

Volumele injectabile mici pot fi sterilizate prin autoclavare (ambalate în fiole), filtrare, urmată de ambalarea aseptică în ambalaje din plastic.

Dacă produsul nu este sterilizat în ambalajul final, se pot include prezervanţi pentru a reduce riscul contaminării.

Termostabilitatea componentelor active din produs va impune metoda de sterilizare. Produsele care sunt stabile în soluţii apoase sunt sterilizate prin autoclavare.

Stabilitatea chimică. În soluţii apoase numeroase medicamente se modifică; dacă transformarea are loc prin oxidare, este necesară adiţionarea unui agent reducător (ex. metasulfit de sodiu în cazul injecţiilor cu adrenalină).

Soluţiile altor medicamente nu pot fi stabilizate şi în acest caz se sterilizează produsul, prin căldură uscată (2h, 160^0) în ambalajul final şi se dizolvă imediat înaintea utilizării, în apă distilată

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sterilă. Pentru compuşii termolabili şi instabili în soluţie apoasă, soluţiile sterile obţinute sunt liofilizate în recipientul final şi reconstituite înainte de utilizare.

Soluţii injectabile uleioase în volume mici

Uleiurile vegetale sunt utilizate pentru dizolvarea unor compuşi insolubili în apă; suspensiile uleioase injectabile se administrează subcutanat sau intramuscular.

Uleiurile vegetale sunt vehicule pentru preparate parenterale cu actiune prelungită, tip depozit (ex. compuşi hormonali). Ca vehicul mai pot fi utilizate uleiurile metabolizabile fixe (de arahide, de susan) sau esteri cum ar fi etiloleatul care este de asemenea metabolizabil. Nu se folosesc niciodată uleiurile minerale. Etiloleatul este mai puţin vâscos, uşor de administrat dar efectul depozit este de scurtă durată. Medicamentul este solvit în ulei, filtrat sub presiune şi repartizat în fiole care după închidere sunt sterilizate prin căldură uscată (2h, 160^0 C).

Prezervanţii sunt ineficienţi în acest mediu şi prezenţa lor oferă o protecţie nesemnificativă împotriva contaminării bacteriene.

Lichidele sterile neinjectabile

În spital se utilizează numeroase tipuri de soluţii sterile, cum ar fi apa distilată neinjectabilă, soluţiile de irigare urologică, soluţii pentru dializă peritoneală şi hemodializă, soluţii pentru inhalaţii.

Apa neinjectabilă este sterilă, utilizată în diverse proceduri chirurgicale pentru irigarea leziunilor, umectarea ţesuturilor, spălarea mănuşilor chirurgicale şi a instrumentarului pe durata utilizării şi când este caldă, ca hemostatic. Se mai utilizează soluţiile saline izotone. Apa topică se condiţionează în containere de polietilenă sau polipropilenă, în volume de 500 ml – 1l.

Soluţiile pentru irigarea urologică sunt utilizate pentru spălarea tractului urinar. Se mai utilizează soluţia de glicină pentru a elimina riscul hemolizei intravasculare când sunt utilizate instrumente electrochirurgicale. Soluţiile sterile sunt ambalate în containere de plastic, în volume de până la 3l.

Soluţiile pentru dializă peritoneală şi hemodializă

Soluţiile pentru dializa peritoneală sint introduse în cavitatea peritoneală pentru îndepărtarea reziduurilor şi a produşilor toxici rezultaţi din alterarea funcţiei renale sau otrăvirilor. Astfel se elimină din sânge prin peritoneu, cu ajutorul dializei substanţele toxice. Soluţiile pentru dializă sunt

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

asemănătoare cu lichidul extracelular (serul sanguin)sub aspectul conținutului în electroliți, pentru ca în timpul dializei să nu apară pierderi în electroliți și apă. Soluțiile se sterilizează 20 minute la 120^0C, după care se face o răcire rapidă pentru a evita colorarea soluțiilor. Soluțiile conțin electroliți și glucoză (1,4 – 7% m/v), echivalentul potasiului liber din lichidul extracelular. Ca sursă de ioni de bicarbonat se adaugă lactat sau acetat. Soluții slab hipertonice sunt utilizate frecvent pentru creșterea conținutului în apă din compartimentul intravascular. Soluțiile hipertonice, care conțin glucoză în cantități mari sunt utilizate pentru eliminarea rapidă a apei. Cavitatea pritoneală este separată de organele interne printr-o membrană semipermeabilă și dacă o soluție perfuzabilă caldă, de până la 5 litri, este perfuzată în cavitatea timp de 30 – 90 minute, este eliminată complet. Deoarece aceste proceduri necesită cantități mari de lichide,ambalarea lor se face în recipiente de 2,5 litri.

Hemodializa este procesul prin care sângele pacientului este trecut printr-un dispozitiv din material semipermeabil astfel că produșii reziduali trec în fluidul de dializă și sângele se reîntoarce în sistemul circulator. Soluțiile de dializă trebuie să fie sterile.

Soluții inhalante (bronhodilatatoare, steroizi) sunt introduse direct în plămâni, în cursul atacurilor asmatice acute severe. Medicamentele sunt diluate în volume mici în apă pentru injecții, înainte de a fi depozitate în rezervorul dispozitivului. Soluțiile nu conțin prezervante și sunt sterilizate în forma finală, în doze unice.

Preparatele oftalmice

Produsele farmaceutice destinate instilării pe suprafața ochiului sunt formulate în soluții apoase sau într-o bază uleioasă, sau unguente oftalmice. Toate preparatele oftalmice sunt sterile deoarece există riscul contaminării mai ales când corneea este lezată.

Un alt tip de produs oftalmic steril este soluția pentru curățarea și păstrarea lentilelor de contact.

Soluțiile oftalmice sunt prezentate pentru utilizare în doză unică (ambalaje de plastic cu 0,3 – 0,5ml lichid) sau flacoane multidoze, cu dop picurător, cu un volum de 10 ml. Deoarece picurătorul se poate contamina ușor prin atingerea de mână sau țesutul infectat, este obligatoriu ca produsul să fie protejat de contaminare prin încorporări de prezervanți: nitrat sau acetat fenilmercuric (0,002% m/v), clorhexidinacetat (0,01% m/v), tiomersal (0,01% m/v), clorură de benzalconiu (0,001% m/v). Acești conservanți sunt inofensivi pentru cornee și conjunctivă. Conservanții trebuie să fie activi asupra *Pseudomonas aeruginosa*, sursă majoră pentru infecțiile

oculare. Clorura de benzalconiu este cel mai activ conservant recomandat, dar nu poate fi utilizat deoarece este incompatibil cu majoritatea compuşilor utilizaţi în tratarea infecţiilor oculare; aceasta se utilizează pentru conservarea picăturilor oculare care conţin anestezice.

Sărurile de mercur acţionează în cantităţi mici dar prezintă pericolul depunerii de mercur pe cornee, mai ales prin aplicări repetate.

Clorhexidina, în concentraţii de 1:17 500 – 1:50 000 nefiind tensioactiv, nu lezează ochiul.

Nipaginul şi nipasolul sunt agenţi bacteriostatici mai puţin activi şi ca urmare trebuie folosiţi în concentraţii mari, care produc iritaţii ale ochiului.

Clorura de benzalconiu mai reacţionează cu cauciucul natural, cauciucul siliconic, butil-cauciucul şi dopurile din aceste materiale trebuie înlocuite. Deoarece dopurile din cauciuc siliconic sunt permabile pentru vaporii de apă, produsele nu trebuie păstrate mai mult de 3 luni de la preparare. Ca toate componentele din cauciuc, dopurile trebuie preechilibrate cu conservanţi înaintea utilizării. Soluţiile termostabile sunt sterilizate la 121^0 C, 15 minute. Soluţiile oftalmice termolabile sunt sterilizate prin filtrare şi închise aseptic în recipiente sterile. Soluţiile ambalate în recipiente din plastic sunt preparate aseptic.

Pentru a diminua riscul contaminării prin utilizare repetată sau prin creşterea unor microorganisme rezistente în soluţie, utilizarea este limitată la o lună după prima deschidere a recipientului. În spital, această perioadă se reduce la 7 zile când produsul este utilizat pentru tratarea unui singur ochi al aceluiaşi pacient. Scurtarea perioadei este impusă de riscul mare de contaminare în mediul de spital, cu patogeni potenţiali, mai ales *Pseudomonas*. În cazul intervenţiilor chirurgicale pe ochi, nu se folosesc soluţii cu prezervanţi, care sunt citotoxici; ideală este utilizarea preparatelor în doză unică.

Loţiuni oculare

Loţiunile oculare sunt soluţii izotonice utilizate pentru spălarea ochiului şi sunt sterilizate în volume relativ mari (100 ml sau mai mult), prin autoclavare în sticle brune, închise cu dop de cauciuc şi buşon sau în recipiente de plastic cu dop înfiletat. Dacă sunt utilizate mai mult de 7 zile, în mediu domiciliar trebuie să conţină şi agenţi prezervanţi. Dacă sunt utilizaţi pentru o singură spălare, nu este necesară încorporarea de agenţi prezervanţi; după 24 ore soluţia se aruncă.

Unguentele oftalmice

Sunt preparate într-o bază semisolidă, filtrată pentru îndepărtarea particulelor şi sterilizată 2h la 160^0 C. Antibioticul este încorporat înainte de sterilizare, dacă este stabil termic sau adăugat aseptic în baza sterilă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În final produsul este ambalat aseptic în tuburi de aluminiu sau plastic, curate, sterile. Dacă produsul nu conține apă, pericolul ca bacteriile să prolifereze este minim.

Soluțiile pentru lentilele de contact

Lentilele de contact se contaminează uşor şi sunt o sursă de infecție pentru ochi. Lentilele trebuie curățate cu soluții sterile, neiritante şi protejate de contaminarea microbiană pe durata utilizării şi păstrării.

Soluțiile de umezire sunt utilizate pentru hidratarea lentilelor după dezinfecție; sunt echivalente izotonic cu secrețiile lacrimale şi au pH-ul aproximativ 7,2.

Soluțiile de curățare îndepărtează depozitele proteice şi alte impurități de pe lentile; conțin un surfactant ca agent de curățare; sunt protejate de contaminare prin încorporare de agenți prezervanți; pH-ul este de aproximativ 7,2.

Soluțiile de impregnare sunt folosite pentru dezinfecția lentilelor şi menținerea lor în stare de hidratare. Clorura de benzalconiu şi clorbutolul se leagă puternic în cazul lentilelor de contact hidrofile şi nu pot fi utilizate pentru dezinfecție. Cele mai utilizate produse pentru dezinfecția lentilelor sunt clorhexidina şi tiomersalul.

Concentrațiile tuturor prezervanților utilizați în soluțiile pentru lentilele de contact sunt mai scăzute decât cele din soluțiile oftalmice, pentru a diminua iritabilitatea.

Se mai utilizează peroxidul de hidrogen, care trebuie inactivat înainte de aplicarea lentilei pe ochi. Lentilele se mai pot steriliza prin fierbere în soluție salină izotonă.

Pansamentele

Pansamentele şi materialele chirurgicale sunt utilizate larg în medicină. Leziunile chirurgicale sau traumatice, arsurile sunt protejate de pansamente sterile, ambalate în aşa fel încât să poată fi aplicate aseptic.

Sterilizarea acestora se face prin autoclavare, căldură uscată, oxid de etilen, radiații ionizante, funcție de natura componenților. Multe fibre celulozice şi sintetice rezistă la autoclavare. Pansamentele care conțin ceară nu pot fi sterilizate prin căldură umedă. Ambalarea pansamentelor trebuie să asigure sterilizarea corectă (să permită de exemplu pătrunderea vaporilor fiebinți sau a oxidului de etilen) şi să mențină produsul steril până la utilizare. Pansamentele pot fi sterilizate în autoclave în care aerul este înlocuit cu vapori sau în autoclave cu prevacuum în care virtual tot aerul

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este îndepărtat înainte de introducerea aburului; în acet fel se scurtează timpul de sterilizare (3 minute la 134^0 C).

Mai recent se utilizează pansamentele – spray; unul din aceste tipuri conține un polimer acrilic dizolvat în acetat de etil şi ambalat ca aerosol. Filmul, după aplicare, poate menține sterilitatea unor plăgi curate până la două săptămâni. Acest tip de pansament se aplică numai pe rănile curate, relativ uscate.

Implanturile

Implanturile sunt mici cilindri sterili ai unui produs farmaceutic, inserați sub tegument sau intramuscular care asigură absorbția lentă şi o acțiune terapeutică prelungită. Aceste produse sunt insolubile în apă (hormoni) şi implantul asigură o rată de solubilizare suficientă pentru efectul terapeutic. În *United States National Formulary* (1990) este descris *oestradiolul* iar în British Pharmacopoeia (1993) - *testosteronul*. Implanturile sunt preparate numai din produsul pur, tabletat prin compresie sau fuziune; orice alt ingredient este exclus, deoarece poate fi toxic sau poate influența rata de difuzie a medicamentului. Compresia se face în condiții aseptice, utilizând materiale şi dispozitive sterile. După preparare, suprafața implantului este sterilizată prin inmersare în soluție de nitrat fenilmercuric 0,002% m/v, la 75^0 C pentru 12 ore. După ce suprafața s-a uscat, fiecare implant este pus aseptic într-o fiolă sterilă cu dop de vată la ambele capete. Se reduce astfel riscul deteriorării şi a aderării spiculelor de sticlă pe implant, formate prin deschiderea fiolei.

Hemostatice absorbabile

Reducerea pierderilor de sânge în timpul intervențiilor chirurgicale, prin ligatură sau suturare este uneori imposibilă şi adesea este înlocuită cu aplicarea de hemostatice absorbabile sterile. Acestea sunt formate dintr-un strat moale (acoperit cu un material solid), amplasat în jurul şi peste leziune şi care lăsat în situ se poate absorbi în țesut după o perioadă de aproximativ 6 săptămâni. Principalul mecanism de acțiune constă în abilitatea de a stimula ruperea *plachetelor*, deoarece au suprafața fibroasă sau rugoasă şi acționează ca o matriță pentru coagularea completă a sângelui. Curent se utilizează 4 produse: oxiceluloza, burete de gelatină absorbant, fibrina spongioasă umană şi alginat de calciu.

RCU "IASI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Oxiceluloza este un material parțial oxidat; țesătura albă este cea mai comună formă dar este utilizată şi sub formă de scame. Este absorbită în organism în 2 – 7 săptămâni, funcție de dimensiune. Acțiunea se bazează pe un efect mecanic şi este utilizată în stare uscată.

Gelatina spongioasă absorbabilă este o gelatină spongioasă insolubilă obținută prin agitarea unei soluții încălzite de gelatină până se obține o spumă uniformă care este uscată. Se taie în forme adecvate, se ambalează în recipiente metalice sau din hârtie şi se sterilizează prin căldură uscată la 150^0 C, 1 oră. Înaintea utilizării se umezeşte cu soluție salină normală care conține trombină.

Fibrina umană spongioasă este un burete uscat din fibrină umană preparat prin coagularea unei spume de soluție de fibrinogen uman cu trombină umană. După liofilizare, este tăiată în forme adecvate şi sterilizată prin căldură uscată la 130^0 C, 3 ore. Înainte de utilizare este saturată cu soluție de trombină. Coagularea sângelui are loc prin contactul cu trombina din interstițiile materialului spongios.

Alginatul de calciu este compus din săruri de calciu şi sodiu ale acidului alginic, formate într-un material fibros sau o pulbere şi sterilizată prin autoclavare. Aceasta ajută coagularea prin formarea unui complex sodiu-calciu alginat în contact cu țesuturile fluide, acționând ca un hemostatic mecanic. Se absoarbe relativ uşor şi unele resturi mai pot rămâne în țesuturi.

Ligaturile şi suturile chirurgicale

Utilizarea unui material standard pentru a lega vasele de sânge şi a coase (sutura) plăgile este de maximă importanță în chirurgie. Materialele utilizate sunt absorbabile şi neabsorbabile.

Catgut-ul chirurgical sterilizat este un fir absorbabil de colagen, obținut din țesut de mamifer, mai ales intestin de oaie. Având în vedere sursa, deseori spori ai unor bacterii pot fi prezenți în acest material. Sterilizarea este dificilă, deoarece colagenul se transformă în gelatină sub acțiunea căldurii umede.

Metoda oficială constă în împachetarea firului de catgut (până la 350 cm) pe un ax metalic, într-un recipient de sticlă cu un lichid de extracție care menține flexibilitatea şi elasticitatea firului după sterilizare.

Cea mai adecvată metodă de sterilizare ar fi expunerea la radiații gamma; pierderea elasticității este minimă şi containerul poate fi supraambalat înainte de sterilizare pentru a asigura sterilitatea suprafeței acestuia şi deschiderea aseptică. O metodă alternativă constă în imersarea firului de sutură într-un fluid de extracție (obişnuit alcool etilic 96% cu sau fără nitrat fenilmercuric 0,002% m/v) şi menținut suficient pentru a se face sterilizarea. O metodă neoficială de sterilizare constă în imersarea firului de catgut într-un solvent (toluen sau naftalină) şi încălzirea la 160^0 C . Catgut-ul începe să devină tare şi fragil în timpul acestui proces şi este transferat aseptic într-un fluid apos pentru restaurarea elasticității şi flexibilității. Ambalarea se face în containere de sticlă

sau plastic, pentru o singură utilizare; dacă mai rămâne material, se aruncă. Catgut-ul dur (întărit) se prepară prin tratarea firului cu agenți care prelungesc rezistența la digestie.

Materialele de sutură neabsorbabile pentru ligaturi şi suturi sunt fire de metal sau materiale organice care nu produc reacții ale organismului şi pot fi sterilizate, de preferat prin autoclavare sau cu radiații gamma. Ambalarea se face în containere de sticlă sau plastic, de unică utilizare. Aceste materiale sunt: nylon, mătase şi fire de oțel inoxidabil.

Instrumentarul şi echipamentul

Instrumentele se sterilizează funcție de stabilitatea fizică (Tabel 20.1).

Obținerea produselor sterile în zonele aseptice

Produsele sterile se grupează în două tipuri:

- Produsele preparate în spații curate, transferate în containerul final, sigilate şi sterilizate prin metode adecvate. Acestea sunt "sterilizate terminal" şi necesită prepararea în zonele curate.

- Produse care nu pot fi sterilizate terminal şi sunt obținute aseptic din materiale sterile sau sterilizate prin filtrare, înaintea ambalării în containerul final. Acestea sunt "preparate aseptic" şi necesită obținerea în zone aseptice.

In acest context, zonele curate sunt încăperile supuse unui control special privind contaminarea microbiană, construite şi utilizate astfel încât să fie diminuată introducerea, proliferarea şi reținerea contaminanților în zonă. Zona aseptică este o încăpere sau o suită de încăperi sau spații speciale, amplasate într-un sector curat, astfel construit şi utilizat încât să prevină contaminarea microbiană a produselor.

Design-ul zonelor curate şi aseptice

Produsele sterile se obțin în incinte separate de alte zone de producție. Spațiul trebuie să fie astfel repartizat încât să sigure separarea fiecărei etape de producție dar şi siguranta fluxului de producție (Fig.20.1). Produsele sterile sunt menținute în carantină până la obținerea rezultatelor testelor de sterilitate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 20.1 Metode utilizate pentru sterilizarea sau dezinfecția echipamentului

Echipament	Metoda de tratament	Dezinfecție / sterilizare	Metoda preferată	Observații
Seringi (sticlă)	Căldură uscată	Sterilizare	Căldură uscată, folosind seringi asamblate	Nu se recomandă autocalvarea, căldura umedă pătrunde mai greu deşi piesele sunt sterilizate separat
Seringi (sticlă) demontate	Căldură umedă	Sterilizare		
Seringi (dispozabile)	Radiații gamma Oxid de etilen	Sterilizare	Radiații gamma	
Ace complet metalice	Căldură uscată	Sterilizare	Căldură uscată	
Ace dispozabile	Oxid de etilen	Sterilizare	Radiații gamma	
Instrumente din metal	Autoclav Căldură uscată	Sterilizare	Căldură uscată	Marginile cuțitelor trebuie protejate de deteriorarea mecanică
Instrumente dispozabile	Radiații gamma Oxid de etilen	Sterilizare	Radiații gamma	
Mănuşi de cauciuc	Autoclav Radiații gamma Oxid de etilen	Sterilizare	Radiații gamma	Uşoară degradare oxidativă când se utilizează autoclavul cu vacuum
Aparatură respiratorie	Autoclav Căldură umedă (aburi la temp. scăzută sau apă la 80^0 C)	Sterilizare Dezinfecție	Sterilizare cu abur când este posibil	Substanțele chimice nu sunt recomandate; sunt ineficiente şi periculoase pentru pacient
Aparat pentru dializă	Chimică	Dezinfecție	Formalină	Oxidul de etilen nu este recomandat
Echipament fragil, sensibil la căldură	Oxid de etilen	Sterilizare Dezinfecție	Oxid de etilen dar cu avizul specialistului	

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

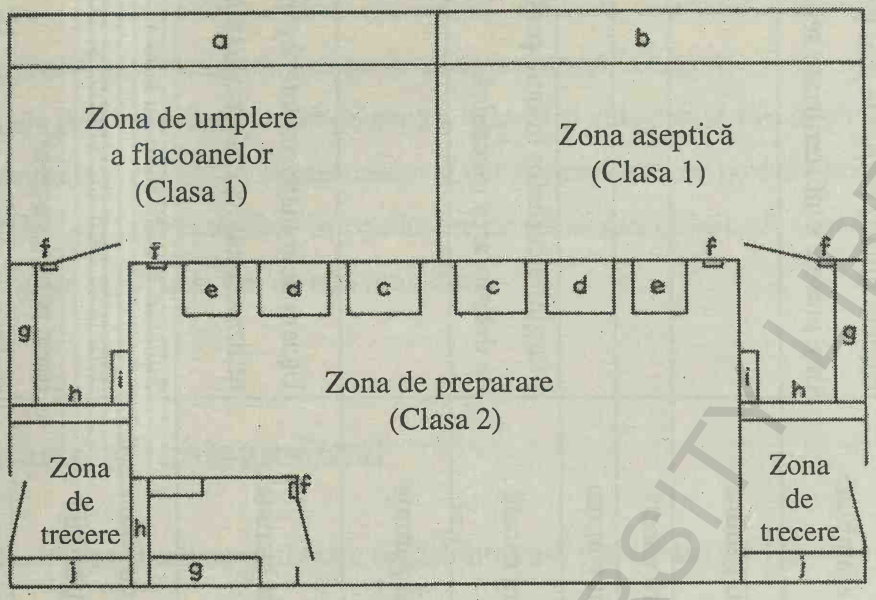


Fig.20.1 Reprezentarea schematică a sectorului pentru obținerea produselor farmaceutice sterilizate final şi preparate aseptic.

(a). zona cu sursa de aer laminar vertical; (b). zona cu asursa de aer laminar orizontal; (c).autoclav; (d). dispozitiv de sterilizare cu aer cald; (e). trapă de transfer; (f). loc de comunicare; (g). raft pentru echipament; (h). perete; (i). bazine de spălare/uscare; (j). dulap haine.

Surse de contaminare

Microorganismele şi particulele inerte provin din aceleaşi surse şi design-ul zonelor curate şi aseptice impune eliminarea surselor posibile de contaminare.

Atmosfera nu este un suport pentru creşterea microbiană dar este permanent contaminată cu un număr mare de particule şi microorganisme. O mare parte din particulele de praf provin din sol şi poartă microorganisme specifice: spori de *Bacillus* şi *Clostridium*, ciuperci şi mucegaiuri. Aerul conţine de asemenea microorganisme de origine umană: *Staphylococcus* şi streptococi beta-hemolitici, care ajung în atmosferă din căile respiratorii, cu picăturile eliminate prin vorbire, tuse,strănut (Tabel 20.2).

Manipularea aseptică trebuie efectuată în atmosferă sterilă creată de dispozitivul de aer laminar.

Pentru controlul contaminării atmosferei sunt două metode principale care au la bază, procesul de filtrare pentru reţinerea particulelor şi microorganismelor:

a). *Fluxul convenţional.* Aerul filtrat este împins în încăpere şi produce o presiune pozitivă comparabilă cu cea din exterior, dar curenţii antrenează particulele şi le scoate afară (Fig.20.2A).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 20.2 Surse de contaminare microbiană

Apă	Specii Gram-negative: *Pseudomonas, Xanthamonas, Flavobacterium, Achromobacter*
Aer	Spori de mucegaiuri: *Penicillium, Mucor, Aspergillus* Spori bacterieni: *Bacillus spp.* Ciuperci Micrococi
Materii prime Caolin Pigmenţi Amidon Gume Produse animaliere	 Spori de *Clostridium spp.* *Salmonella* Coliformi *Actinomyces* *Salmonella* Coliformi
Personalul	Coliformi Stafilococi Streptococi Corynebacterii

b). *Fluxul laminar*. Aerul intră în cameră printr-un sistem de filtre şi iese prin alte filtre, amplasate pe peretele opus (Fig.20.2B).

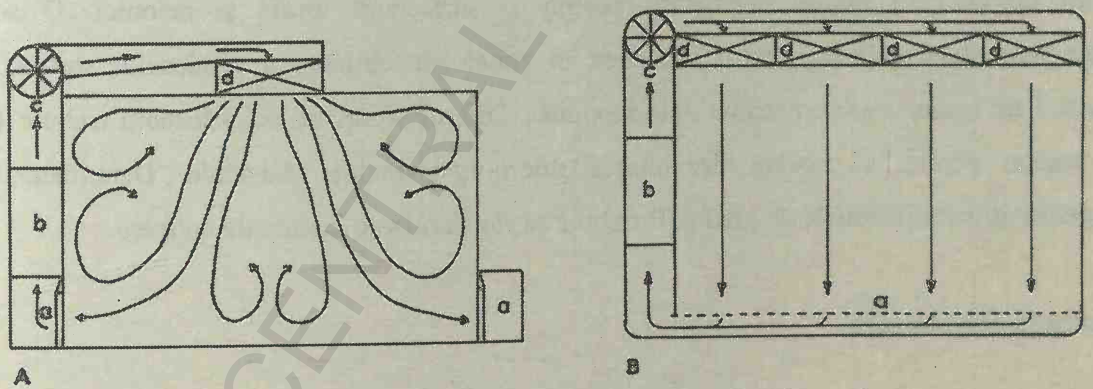


Fig.20.2 Prezentarea schematică a tipurilor de aer laminar

(A) flux convenţional; (B) flux unidirecţional vertical; (a) Ieşire, (b) unitate de condiţionare a aerului, (c) ventilator, (d) filtru HEPA

Operatorii. Tegumentul, părul şi îmbrăcămintea operatorului sunt surse de contaminare cu particule şi microorganisme: stafilococi, difterimorfi, fungi şi ciuperci dermatofile. Igiena precară a personalului are ca rezultat prezenţa pe tegument a coliformilor şi altor bacterii intestinale.

Operatorul este sursa principală a contaminării cu microorganisme şi particule. Contaminarea din sursă umană poate fi controlată prin limitarea numărului operatorilor din zona

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

curată, limitarea mişcărilor, izolarea faţă de produse şi mediu cu echipament de protecţie adecvat. Personalul care suferă de boli transmisibile nu trebuie utilizat în zonele curate sau aseptice. Operatorii trebuie să comunice orice afecţiune: leziuni tegumentare, infecţii respiratorii, tulburări gastrointestinale, care ar putea fi surse de răspândire a unui număr mare şi specii de microorganisme. Controlul medical periodic al personalului este obligatoriu. Accesul în zonele curate şi aseptice este permis numai persoanelor autorizate.

Materiile prime contribuie într-o mare măsură la contaminarea cu particule şi microorganisme a produselor farmaceutice. Apa este o materie primă care este o sursă particulară de contaminare şi dacă nu este corect preparată, păstrată şi distribuită, poate fi o sursă de bacterii Gram-negative, cum ar fi *Pseudomonas*.

Materialele de ambalat şi pentru închidere sunt o sursă de contaminare mai ales pentru soluţiile parenterale.

Echipamentul. Design-ul echipamentului de fabricaţie poate fi o cauză a contaminării microbiene. Praful de asemenea poate fi generat în cursul funcţionării. Pe suprafaţa externă a echipamentului sedimentează particule şi picături din atmosferă, care reprezintă o sursă de contaminare.

Curăţarea şi dezinfecţia sunt esenţiale pentru a menţine contaminarea la un nivel minim. Agenţii de curăţare includ detergenţi alcalini şi surfactanţi ionici şi neionici. O serie de dezinfectante sunt indicate pentru utilizarea în zonele de obţinere a produselor sterile: fenoli, hipoclorit de sodiu, etanol, cetrimid, clorhexidina. Diferite tipuri de dezinfectanţi trebuie folosite prin rotaţie pentru a preveni dezvoltarea microorganismelor rezistente. Dezinfectantele şi detergenţii utilizaţi în zonele de grad A/B trebuie să fie sterilizate înainte de aplicare.

Intrarea în zona curată

In zona curată, pasajul se face din "zona neagră" spre "zona gri" printr-un perete mobil. După spălarea mâinilor operatorul poate intra în camera curată.

Intrarea în zonele aseptice se face prin respectarea procedeului trecerii prin "negru-gri-alb".

In această schemă, înaintarea de la "negru" la "alb" se face prin zona cu o curăţenie sporită, zona "gri" fiind un stadiu înaintea intrării în zona "albă" (aseptică). Deplasarea de la "negru" la "alb" se face în general prin două încăperi, zona "gri" servind de asemenea pentru intrarea în zona curată. In zona neagră operatorul îşi lasă hainele încălţămintea, îşi şterge picioarele de pragul separator al încăperii şi-şi pune încălţămintea adecvată. Apoi intră în zona "gri" şi după spălarea mâinilor şi braţelor, le usucă, îşi fixează masca şi capişonul. Se spală din nou pe mâini şi antebraţe

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

după care operatorul intră în zona albă unde îmbracă echipamentul special destinat lucrului în zona sterilă, inclusiv husele de protecție pentru încălțăminte și mănușile. Apoi mâinile cu mănuși se clătesc cu o soluție dezinfectantă și astfel poate intra în zona aseptică și începe lucrul.

Bibliografie

Popescu C, Brăileanu C. *Indreptar farmaceutic*. Editura Medicală, București: 237-293.

Fica C. *Indreptar practic pentru prepararea medicamentelor*, Editura Medicală, București: 134-209.

Farmacopeea Română, ediția a X-a, Editura Medicală 1071-1101.

Europea Pharmacopeia. *Biological testo*. 1997.

The United States Pharmacopeia (USP-23). 1995 *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Ed. K. Helrich, fifteenth edition, Arlington, Virginia: 360-361, 1990.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

21

Contaminarea produselor farmaceutice nesterile în spital şi în mediul comunitar

În ultimii ani industria de medicamente a reuşit să amelioreze calitatea produselor nesterile, astfel ca majoritatea să conţină un număr minim de microorganisme. Totuşi, sunt şi produse în număr redus, care conţin un nivel şi un tip de contaminare inacceptabile, care au scăpat controlului de calitate şi contribuie la răspândirea infecţiilor în rândul pacienţilor.

Semnificaţia contaminării microbiene

Degradarea

Contaminarea microbiană, alături de modificările chimice şi fizice ale produselor farmaceutice duce la degradarea acestuia.

Contaminarea fizică constă în prezenţa diverselor impurităţi mecanice în produs: fibre de celuloză, aşchii metalice provenite de la dopul flacoanelor, fragmente de cauciuc, celofan, sticlă, materii prime precipitate.

Contaminarea chimică poate proveni uneori din materii prime (ex. DDT în lanolină) sau din instalaţiile curăţate necorespunzător. Astfel penicilina poate contamina alte produse care se obţin pe aceleaşi instalaţii (mixere, echipamente de granulare, tabletare) insuficient curăţate.

Principiile active care intră în componenţa produselor farmaceutice pot fi metabolizate şi îşi pierd din eficienţă sau devin inactive.

Modificările fizice constatate în mod obişnuit constau în separarea emulsiilor, creşterea vizibilă la suprafaţa formelor solide şi formarea unui strat de slim, apariţia de pelicule sau sedimente în lichide, asociate uneori cu producerea de gaz, mirosuri sau gust neplăcut, care fac produsul inacceptabil şi primejdios pentru pacient.

În consecinţă degradarea şi pierderea eficacităţii produsului are implicaţii serioase pentru producător.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Riscurile pentru sănătate

Produsele farmaceutice contaminate reprezintă un risc potențial pentru sănătatea pacientului. Infecții asociate cu produsele medicamentoase au fost semnalate de la începutul secolului, dar în ultimii 30 de ani semnificația contaminării pecienților prin intermediul acestora, a fost lămurită complet. Este o şansă ca medicul din spital să recunoască încă în stadiul inițial, manifestările unei infecții invazive, apărute, de exemplu, după administrarea unor soluții perfuzabile intravenoase. Posibilitatea ca o infecție discretă asociată cu administrarea unui medicament, care s-a răspândit după câteva luni, în diverse grupuri de pacienți să fie identificată de practician, este foarte puțin probabilă. Dacă a fost recunoscută infecția, este o obligație morală ca produsul incriminat să fie retras şi trebuie făcute investigații pentru a constata dacă nu au mai fost anterior alte incidente.

Produsele farmaceutice, în diferite forme sunt supuse contaminării cu diverse microorganisme (Tabel21.1).

Tabel 21.1 Microorganisme care pot contamina produsele farmaceutice

Anul	Produsul	Contaminantul
1907	Vaccinul ciumei	*Clostridium tetani*
1943	Picături oftalmice cu fluoresceină	*Pseudomonas aeruginosa*
1946	Pudra de talc	*Clostridium tetani*
1948	Servaccinul	*Staphylococcus aureus*
1955	Dezinfectant cu cloroxilenol	*Pseudomonas aeruginosa*
1966	Tablete de tiroidă	*Salmonella muenchen*
1966	Unguent oftalmic cu antibiotic	*Pseudomonas aeruginosa*
1966	Soluție salină	*Serratia marcenscens*
1967	Carmin pulbere	*Salmonella cubana*
1967	Cremă de mâini	*Klebsiella pneumoniae*
1969	Apă mentolată	*Pseudomonas aeruginosa*
1970	Soluție antiseptică cu Clorhexidim - cetrimid	*Pseudomonas cepacia*
1972	Soluție intravenoasă	*Pseudomonas, Erwinia, Enterobacter spp.*
1972	Pudră de pancreas	*Salmonella agona*
1977	Soluție pentru lentile de contact	*Serratia, Enterobacter spp.*
1981	Echipament chirurgical	*Clostridium spp.*
1982	Soluție iodoforă	*Pseudomonas aeruginosa*
1983	Săpun lichid	*Pseudomonas stutzeri*
1984	Tymol	*Pseudomonas aeruginosa*
1986	Soluție antiseptică dentară	*Coliformi*

Dezinfectantele, antisepticele, pudrele şi alte produse care conțin compuşi nutritivi, cum ar fi cremele şi loțiunile cu carbohidrați, aminoacizi, vitamine, apă în cantități apreciabile, utilizate în mediul comunitar, prezintă riscuri, deoarece se pot contamina cu o serie de patogeni, cum ar fi

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clostridium tetani, Pseudomonas aeruginosa , alte bacterii Gram-negative care pot cauza infecţii în anumite condiţii. Efectele utilizării produselor contaminate variază de la pacient la pacient de tipul şi de gradul de contaminare. Cele mai serioase efecte, uneori mortale sunt cauzate de produsele injectabile contaminate. Cei mai frecvenţi contaminanţi cauzează infecţii locale prin contaminarea leziunilor. Aspectul cel mai grav este că majoritatea cazurilor de infecţii asociate medicamentului nu sunt identificate sau raportate ca infecţii a căror sursă este produsul farmaceutic.

Surse de contaminare

Contaminarea în timpul procesului de producţie

Controlul contaminării se face pe parcursul etapelor de producţie şi la sfârşit, după obţinerea produsului final. Se verifică: materiile prime, mai ales apa şi cele de origine animală care trebuie să corespundă unor standarde microbiologice înalte, echipamentul de producţie, care trebuie curăţat după utilizare pentru a preveni contaminarea încrucişată a şarjelor care se obţin pe aceeaşi instalaţie, spaţiile de producţie, care trebuie să asigure sterilitatea pe parcursul fabricaţiei; starea de sănătate a personalului care asigură producţia şi respectarea normelor de igienă personală; ambalarea produsului final care trebuie să prevină contaminarea. Controlul contaminării se face şi în farmaciile de spital.

Apa, una din principalele surse de contaminare în spital, este stocată în tancuri mari şi necesită tratamente speciale, funcţie de scopul în care va fi utilizată: distilare, osmoză reversă, deionizare, pentru a asigura calitatea microbiologică corespunzătoare. Stocarea apei impune precauţii speciale, deoarece numeroase bacterii Gram-negative oportuniste patogene pot supravieţui în apa tratată, pe seama urmelor de materii organice prezente şi se multiplică rapid la temperatura camerei. Apa trebuie păstrată la 80^0 C şi recirculată în sistemul de distribuţie cu o viteză de 1-2 m/s. pentru a preveni formarea biofilmelor pe pereţii conductelor.

Mediul. Miniflora din incinta farmaciei reflectă în general mediul de spital şi activităţile care se desfăşoară aici. Patogenii oportunişti, cum ar fi *Pseudomonas aeruginosa* sunt prezenţi în toate locurile umede (conducte, chiuvete, robinete). Dispozitivele de curăţat (dispozitivele de lustruit, găleţile, maşinile de spălat şi uscat) contribuie la răspândirea acestor microorganisme în jurul farmaciei. Nivelul de contaminare al mediului de producţie poate fi redus prin: respectarea normelor practicii bune de fabricaţie, instalarea unor trape de încălzire la nivelul liniilor în formă de "U"

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pentru a distruge rezervoarele de contaminanți, menținerea în stare de curățenie a echipamentului, inclusiv a echipamentului de curățare.

Ambalajul. Sacii, cutiile de carton, pluta, hârtia nu sunt adecvate pentru ambalarea produselor farmaceutice, deoarece sunt contaminate mai ales cu spori de bacterii şi fungi. Aceste materiale au fost înlocuite cu materiale plastice biodegradabile. Din motive economice, în farmaciile de spital, ambalajele din plastic sunt returnate, contaminate cu microorganisme pe parcursul utilizării. Reutilizarea containerelor trebuie făcută după spălarea şi uscarea lor.

Altă practică frecventă în spital este reambalarea produselor în containere mai mici; aceste manevre cresc riscul contaminării, nivelul contaminării se poate dubla comparativ cu ambalarea inițială.

Contaminarea în procesul obținere

Investigatiile efectuate de *Swedish National Board of Health*, în 1965, au constatat modificări ale calității microbiologice imediat după fabricarea produselor nesterile. O serie de produse sunt contaminate frecvent cu *Bacillus subtilis, Staphylococcus albus*, drojdii, fungi; un număr mare de coliformi a fost identificat în tablete. Au mai fost semnalate, în Suedia şi în două izbucniri infecțioase ca urmare a utilizării unor produse contaminate.

Două sute de pacienți au fost contaminați după administrarea de tablete de tiroidă contaminate cu *Salmonella bareilly* şi *S. muenchen*; opt pacienți au făcut infecții oculare severe după administrarea unui unguent cu hidrocortizon contaminat cu *Pseudomonas aeruginosa*. In România,prima contaminare a fost semnalată în 1961,într-un extract de *Cynara* din care s-au izolat fungi.

În țara noastră calitatea microbiologică şi chimică a produselor farmaceutice trebuie să corespundă exigențelor propuse de *Farmacopeea Română 10* (1993) şi farmacopeele internaționale. În prezent există tendința raționalizării producerii de forme farmaceutice în spital. Conform normativelor de fabricație a produselor farmaceutice (1968), farmaciile de spital trebuie să obțină licență de preparare care să corespundă pe deplin ghidului pentru buna fabricație (*Guide to Good Pharmaceutical Manufacturing Practice*, 1989, revizuit în 1992). Printre alte exigențe, ghidul include utilizarea unor condiții adecvate de mediu în prepararea medicamentelor. Ulterior, *Medicines Control Agency* (MCA) emite în 1992 un ghid referitor la mărimea şarjelor şi frecvența producerii lor.

Contaminarea pe durata utilizării

Produsele contaminate pe parcursul utilizării trebuie retrase mai ales în spital, unde constituie surse de infecții. Cele mai expuse contaminării sunt produsele multi-doze.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sursele umane. Pe durata utilizării, pacientul poate contamina produsul farmaceutic cu flora microbiană proprie (Fig. 1). Riscul cel mai mare îl reprezintă produsele topice, deoarece acestea probabil sunt aplicate cu mâna, mijloc de a introduce contaminanți din flora rezidentă a tegumentului: stafilococi, *Micrococcus spp*., difterimorfi, dar pot fi şi contaminanți tranzitorii, cum ar fi *Pseudomonas*, care în mod normal sunt îndepărtați prin spălare. Contaminarea cu oportunişti poate fi diminuată prin utilizarea unor aplicatoare dispozabile pentru produsele topice sau pentru produsele orale, a unor linguriţe dispozabile.

Odată contaminate, produsele multi-doze, în spitale sunt surse de infecţii încrucişate între pacienți. Produsele pe bază de zinc, ambalate în recipiente de stocare mari şi utilizate în tratamentul şi prevenirea escarelor la paxcienții imobilizați la pat, pot fi contaminate pe durata utilizării cu *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.* În produsele neprezervate se pot multiplica contaminanții, mai ales dacă în formulare este prezentă apa (ex. emulsii) sau aceasta formează un film prin condensarea apei atmosferice.

O altă sursă potențială de contaminare în spital este personalul medical care administrează medicamentele. În timpul activității, mâinile personalului pot fi contaminate cu patogeni oportunişti, care nu fac parte din flora normală a tegumentului, dar care pot fi uşor îndepărtați prin spălarea şi uscarea mâinilor. Uneori spălarea mâinilor după ce au venit în contact cu pacienții este omisă, şi contaminanții pot fi transmişi ulterior prin medicamente, în cursul administrării. (Fig.21.1). Loțiunile şi cremele pentru mâini sunt adesea contaminate, mai ales când sunt ambalate în recipiente multidoze. Spălarea corectă a mâinilor este deosebit de importantă pentru controlul infecției nosocomiale. Loțiunile şi cremele pentru mâini trebuie prezervate şi ambalate în doze pentru o singură utilizare. Alte metode de prevenire a contaminării constau în divizarea produselor pentru uz individual şi aplicarea unor tehnici de administrare a medicamentelor fără a fi atinse.

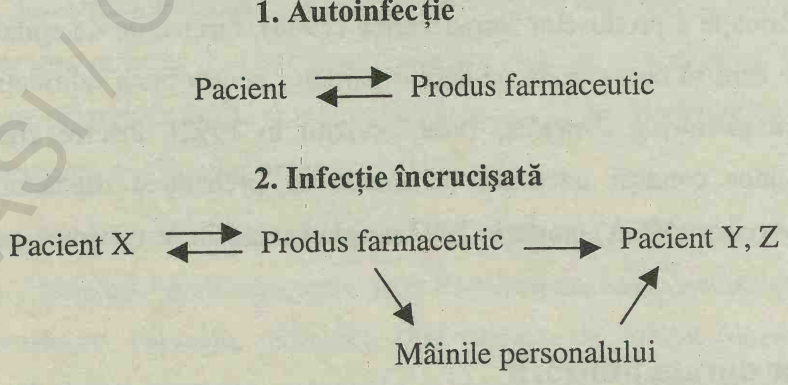


Fig.21.1 Mecanismele contaminării pe durata utilizării produselor farmaceutice

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sursele de contaminare din mediu. Contaminanții din aer pot coloniza în număr mic un produs care este lăsat deschis. Mulți dintre aceştia mor pe parcursul păstrării, restul menținându-se la un nivel de aproximativ $10^2 - 10^3$ unități formatoare de colonii (cfu/g sau ml). Un număr mare de microorganisme din apă pot fi introduse accindental în produsele topice prin mâinile umede sau printr-un mecanism de pulverizare. Aceşti contaminanți sunt nepretenţioşi nutritiv şi prin multiplicare depăşesc nivelul de 10^6 cfu/g sau ml. Aceste aspecte se întâlnesc în spital, dacă produsele sunt păstrate în locuri calde sau acasă, în dulapuri din încăperi de baie cu aer cald şi umed. Produsele utilizate în spitale ca substituienți de săpun pentru igiena pacienților prezintă un risc deosebit, deoarece sunt contaminate cu *Pseudomonas spp.*

Populațiile microbiene nosocomiale (care diferă de cele comunitare) sunt frecvent izolate din produsele farmaceutice utilizate în spital.

Echipamentul medical. Pacienții şi personalul de îngrijire, utilizează diferite obiecte pe durata administrării medicanetelor, mai ales a produselor topice (spatule, bureți, rulouri, tampoane). Acestea se contaminează uşor şi prin reutilizare contribuie la perpetuarea contaminării stocului de produs proaspăt. Pentru a preveni contaminarea trebuie utilizate aplicatoare sau tampoane de unică utilizare. Echipamentul complex utilizat în cursul terapiei: umidificatoarele, incubatoarele, vetilatoarele şi alte aparate trebuie menținute într-o stare de perfectă curățenie şi decontaminate după utilizare. Este posibil ca dezinfectantele utilizate în acest scop să fie contaminate cu patogeni oportunişti ca *Pseudomonas aeruginosa*, care astfel contribuie , în loc să limiteze , la răspândirea infecției printre pacienți.

Contaminarea microbiană cu patogeni şi patogeni oportunişti

Microorganismele care contaminează produsele farmaceutice şi aparatura medicală din spital pot fi clasificate în patogeni şi patogeni oportunişti. Bacterii patogene, cum ar fi *Salmonella spp., Clostridium tetani* sunt mai rar prezenți în produsele farmaceutice. Totuşi au fost semnalate infecții ale plăgilor cauzate de utilizarea unor produse sub formă de pulberi contaminate, inclusiv decese neonatale datorate folosirii pudrei de talc contaminate cu *C. tetani.*

Izbunciri de salmoneloză au fost consemnate prin administrare de pulberi de pancreas sau tiroidă contaminate. Frecvent, din produsele farmaceutice se izolează *P. aeruginosa, Klebsiella, Serratia*, bacterii nepretentioase nutritiv, care supraviețuiesc în aceste preparate, atingând $10^6 - 10^7$ UFC/g sau ml. De cele mai multe ori produsele nu prezintă semne vizibile de contaminare.

Patogenii oportunişti pot supraviețui în deezinfectante şi antiseptice, care deşi sunt utilizate pentru controlul infecțiilor în spital, contribuie de fapt la întreținerea şi răspândirea infecției.

Pacienţii imunocompromişi, traumatizaţi, cu arsuri sunt cei mai expuşi la infecţiile cu aceşti patogeni oportunişti.

Calea de administrare a produselor farmaceutice

Produsele contaminate injectate direct în sânge sau instilate în ochi creează probleme grave. Injecţii intratecale şi epidurale sunt procedee riscante şi se fac de obicei prin filtru bacterian. *Pseudomonas aeruginosa*, care este un contaminant recunoscut al preparatelor oftalmice, produce infecţii oculare severe.

Aciditatea gastrică este o barieră pentru microorganismele care contaminează preparatele farmaceutice orale.

Eficienţa acestei bariere depinde de prezenţa alimentelor şi durata staţionării alimentelor în stomac. Contaminanţii din produsele topice afectează mai puţin tegumentul intact; pielea este ea însăşi o barieră mecanică excelentă şi puţini contaminanţi pot supravieţui în competiţia cu flora rezidentă. Tegumentul lezat (plăgi, chirurgicale, traumatisme, arsuri) este colonizat rapid şi infectat cu patogenii oportunişti. Rezistenţa pacienţilor este foarte importantă în declanşarea infecţiei cauzate de madicamentul contaminat.

Pacienţii spitalizaţi sunt mai expuşi şi mai sensibili la infecţii comparativ cu cei din comunitate. Nou născuţii, persoanele vârstnice, diabeticii, persoanele cu traumatisme, au mecanismele de apărare compromise şi sunt vulnerabile la infecţii. Pacienţii cu leucemie sau care primesc terapie imunosupresoare trebuie să beneficieze numai de produse farmaceutice sterile.

Bibliografie

Baird RM. *Microbial contamination of pharmaceutical products made in a hospital pharmacy.* Pharmy; 234:54-55, 1985.

Baird RM. *Microbial contamination of non-sterile pharmaceutical products made in hospitals in the North East Regional Health Autority.* J Clin Hosp Pharm; 10:95 – 100, 1985.

Hills S. *The isolation of Clostridium tetani from infected talc.* NZ Med J; 45:419 – 423, 1946.

Kallings LO, Ringertz O, Silverstolpe L, Ernerfeldt F. *Microbiological contamination of medicinal preparations.* 1965 Report to the Ewedish National Board of Health. Acta Pharm Suedica; 3: 219-228, 1966.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Morse LJ, Williams HI, Grenn PF, Eldridge EF, Rotta JR. *Septicaemia due to Klebsiella pneumoniae originating from a handcream dispenser*. N Engl J Med; 277: 472-473, 1967.

Noble WC, Savin JA. *Steriod cream contaminated with Pseudomonas aeruginosa*. Lanceti, 347-349, 1966.

Smart R, Spooner DF. *Microbiological spoilage in pharmaceutical and cosmetics*. J Soc Cosm Chem; 23: 721-737, 1992.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

22

Sterilizarea

Sterilizarea este o etapă în procesul de obținere a produselor farmaceutice parenterale sau care vin în contact cu tegumentul şi mucoasele lezate sau organele interne.

Procesul de sterilizare impune aplicarea unor agenți biocizi sau procedee fizice de îndepărtare sau omorâre a microorganismelor de pe produse sau obiecte. In procesul de sterilizare există riscul potențial ca produsul să se degradeze, care, în cazul produselor farmaceutice duce la reducerea eficienței terapeutice sau acceptării de către pacient. Procesul de sterilizare trebuie astfel selectat încât să asigure omorârea sau eliminarea microorganismelor cu o deteriorare minimă a produsului.

Definiții

Decontaminarea: acțiune care permite, pentru un anumit timp, eliminarea, omorârea sau inhibarea microorganismelor în funcție de obiectivele fixate. Rezultatul acestei operațiuni constă în limitarea microorganismelor prezente în momentul operațiunii.

Steril: lipsit complet de microorganisme viabile.

Sterilizare: omorârea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor, formelor vegetative sau spori de pe suprafețe sau substanțe.

Septic: contaminat cu microorganisme.

Aseptic: lipsit de microorganisme.

Asepsie: metode de evitare a contaminării mediului sau a unui substrat a cărui condiție microbiologică trebuie respectată (țesuturi sterile, medii de cultură sterile, sterilitatea preparatelor farmaceutice injectabile).

Dezinfecția: omorârea formelor microbiene vegetative, dar nu obligatoriu şi a sporilor din substanțe sau de pe suprafețe, cu ajutorul agentilor sau a substanțelor dezinfectante.

Antiseptizare: omorârea microorganismelor de pe tegumente, mucoase, plăgi cu substanțe antiseptice.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prezervarea: omorârea sau inhibarea microoganismelor din produsele farmaceutice (seruri, vaccinuri).

Sterilizarea este un proces complex care depinde de o serie de factori:

1. Cunoaşterea curbei de omorâre a bacteriilor reprezentative prin expunerea la procesul de inactivare.
2. Capacitatea de penetrare a agentului inactivant, deosebit de importantă în cazul echipamentului chirurgical sau a materialelor în ambalaj; aburul pătrunde mult mai eficient decât căldura uscată.
3. Capacitatea produsului de a rezista la procesul de sterilizare.
4. Efectul materiilor organice (sânge, fecale, murdării, etc.) care protejează bacteriile şi sporii şi interferă cu procesul de sterilizare. Obiectele trebuie curăţate înainte de sterilizare.

Sensibilitatea microorganismelor la procesele de sterilizare

Formele vegetative ale bacteriilor, fungilor, virusurile mari, au o sensibilitate mai mare la procesele de sterilizare, comparativ cu virusurile mici şi sporii de bacterii şi fungi.

De aceea, în testele pentru eficienţa sterilizării se aleg spori bacterieni rezistenţi, reprezentaţi în mod curent de *Bacillus stearothermophilus* pentru căldura umedă, anumite tulpini de *Bacillus subtilis* pentru căldura uscată şi sterilizarea gazoasă şi *Bacillus pumilus* pentru sterilizarea cu radiaţii.

Agenţii infecţioşi ai encefalitei spongiforme bovine şi ai bolii Creutzfeldt-Jakob sunt foarte rezistenţi la majoritatea agenţior cunoscuţi.

Valoarea D

Rezistenţa unui microorganism la un agent de sterilizare poate fi evaluată prin valoarea D, care pentru agenţii căldură şi radiaţii este definită ca timpul, la o temperatură fixă, sau doza de radiaţii necesare pentru a reduce cu 90% celulele viabile (Fig.22.1).

Metode de sterilizare

Conform British Pharmacopeia (1993) şi FRX (1993) sunt recunoscute 5 metode de sterilizare pentru produsele farmaceutice:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

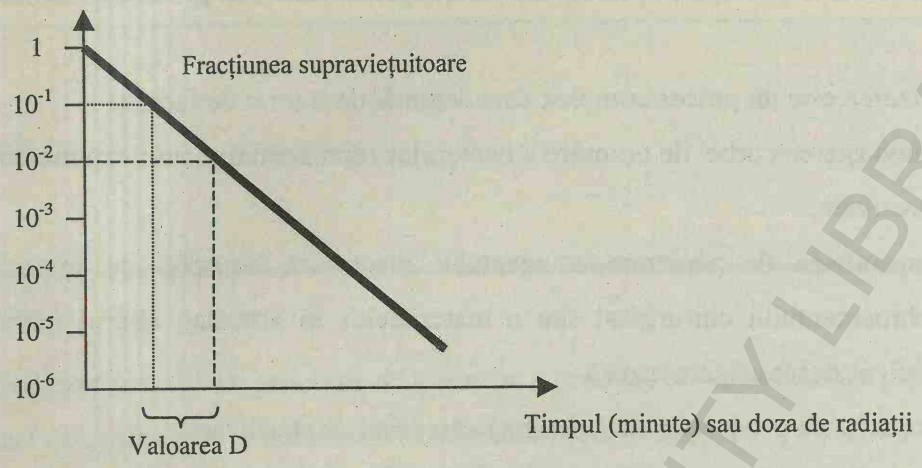


Fig.22.1 Calcularea valorii D

- căldura uscată;
- sterilizarea cu aburi în autoclav;
- filtrarea;
- sterilizarea cu oxid de etilen;
- sterilizarea cu radiații gamma

Se mai folosesc sterilizarea cu aburi şi formaldehidă şi cu raze ultraviolete (UV), în anumite cazuri.

Pentru fiecare metodă, condițiile de expunere pot fi modificate, dar experiența şi stabilitatea produselor impun anumite limite ale parametrilor (Tabe 22.1).

Tabel 22.1 Inactivarea prin diferite procedee de sterilizare şi indicatori biologici ai eficientei procesului

Procedeu de sterilizare	Microorganism indicator	Valoarea D
Căldură umedă (121^{0}C, 15 min)	*Bacillus stearothermophilus*	1,5 min
Căldură uscată (160^{0}C, 2 ore)	*Bacillus subtilis var. niger*	Max. 10 min
Iradiere (2,5 M rad)	*Bacillus pumilus*	0,3 M rad

Sterilizarea prin căldură

Căldura este cel mai utilizat factor de sterilizare, deoarece distruge enzimele şi alți constituienți esențiali ai celulei.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Efectul letal este mai rapid când celula este înstare hidratată, iar temperatura şi timpul sunt mai reduse; în stare de umiditate ridicată predomină reacţiile de hidroliză, iar în stare uscată au loc modificări oxidative.

Sterilizarea prin căldură se aplică produselor termostabile, dar poate fi aplicată şi produselor sensibile sau rezistente la căldura umedă.

Ciclul de sterilzare trece prin trei etape: de încălzire, de menţinere a temperaturii şi de răcire (Fig.22.2).

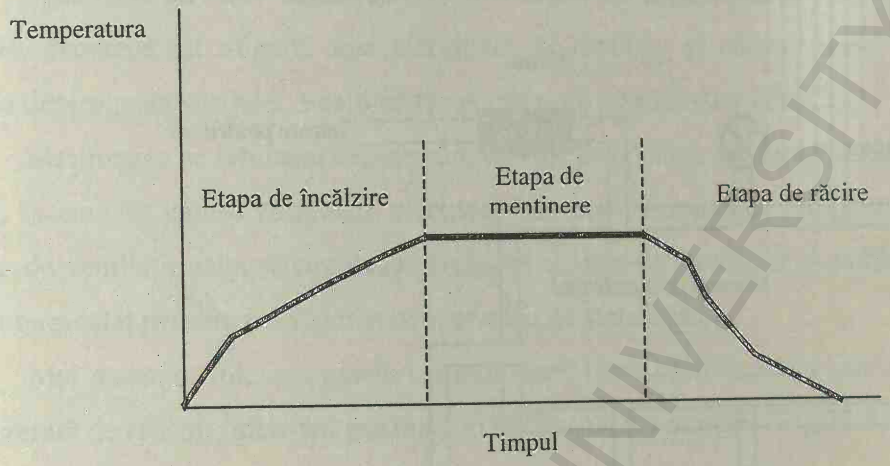


Fig.22.2 Profilul temperaturii în procesul de sterilizare prin căldură

Sterilizarea cu vapori de apă sub presiune

Căldura umedă este un agent biocid eficient, aplicat sterilizării mediilor de cultură, produselor termostabile, instrumentarului (soluţii injectabile apoase, preparate oftalmice, lichide de irigare, echipament de diagnostic şi chirurgical), produselor contaminate.

Sterilizarea cu căldură umedă se face în mod curent la temperaturi de 121 – 134^{0}C în autoclave încălzite electric sau cu gaz, în care aerul a fost complet înlocuit cu vapori de apă sub presiune. Proteinele coagulează şi bacteriile sunt omorâte mai rapid în prezenţa aburului.

Pentru fluidele închise în flacoane şi materiale poroase (ex. echipament chirurgical) se aplică un ciclu standard de temperaturi/timp:121^{0}C pentru 15 min şi 134^{0}C pentru 3 min. (Tabel 22.2). Există o relaţie directă între temperatură şi presinea aburului.

Relaţia între temperatură şi presiune se menţine numai în prezenţa aburului pur. De exemplu, un amestec de 50: 50 aer – abur, la presiunea de 1 atm. are temperatura de 112^{0}C, iar la 2 atm. în loc de 134^{0}C are doar 128^{0}C.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 22.2 Parametrii de sterilizare cu vapori de apă sub presiune

Temperatura (^{0}C)	Timp de menținere (min)	Presiunea aburului (atm)
115	30	0,5
121	15	1
126	10	1,5
134	3	2

Autoclavul este o cameră cu perete dublu sau manta prin care circulă aburul şi intră în camera de sterilizare în care se găsesc obiectele de sterilizat (Fig.22.3).

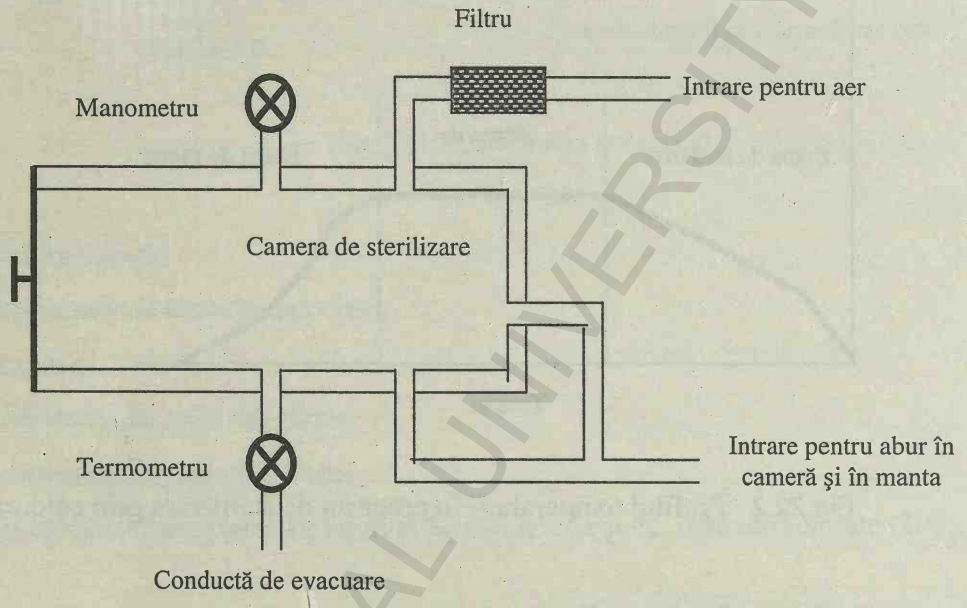


Fig.22.3 Schema autoclavului

Inainte de pătrunderea aburului, aerul este evacuat cu o pompă de vid electrică. După sterilizare aburul este eliminat tot cu ajutorul pompei de vid. Căldura şi vidul obținut asigură uscarea perfectă şi rapidă a materialelor sterilizate. Ruperea vidului se face cu aer trecut printr-un filtru.

Temperatura aburului se verifică cu un termometru plasat pe conducta de evacuare; dacă indică 121^{0}C şi presiunea este de 1 atm, înseamnă că tot aerul a fost evacuat din camera de sterilizare.

Pentru fluidele în flacoane, etapa finală a procesului de sterilizare constă în răcire, necesară pentru a minimaliza degradarea produselor şi a reduce timpul întregului proces. Aceasta se realizează în autoclavele moderne prin pulverizarea de lichid în camera de sterilizare. Uneori apa pulverizată poate fi sursă de contaminare şi de aceea trebuie controlată cu grijă calitatea microbiologică a acesteia.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sterilizarea cu căldură uscată

Efectul letal al căldurii uscate este dat de procesele oxidative care sunt mai puțin eficiente decât distrugerea hidrolitică ca urmare a expunerii la abur. Temperatura de sterilizare cu aer cald este frecvent 160-180^{0}C şi durata de expunere, până la 2 ore. Aplicațiile sunt în general restrânse la sticlărie, instrumentar metalic, lichide neapoase termostabile (vehicule uleioase: vaselină, parafină, oleat de etil, ceruri), pulberi termostabile.

Principala utilizare industrială este în scopul sterilizării flacoanelor de sticlă care se umplu aseptic, deoarece nu asigură doar sterilitatea ci distruge şi endotoxinele bacteriene (pirogene). Pentru depirogenarea sticlei, se aplică temperaturi de aproximativ 250^{0}C.

Sterilizarea se realizează în camere de oțel inoxidabil, cu capacitatea de 250 litri, cu pereți dubli, în care se găsesc rezistențe electrice care permit obținerea temperaturii de sterilizare. Un sistem de ventilație asigură circulația aerului în camera de sterilizare şi uniformizarea temperaturii, iar un termostat permite menținerea temperaturii de sterilizare.

Mai recent se folosesc tuneluri pentru sterilizarea cu aer cald în care căldura este transferată şi asigurată de radiații infraroşii sau tuneluri cu flux de aer laminar (Fig.22.4).

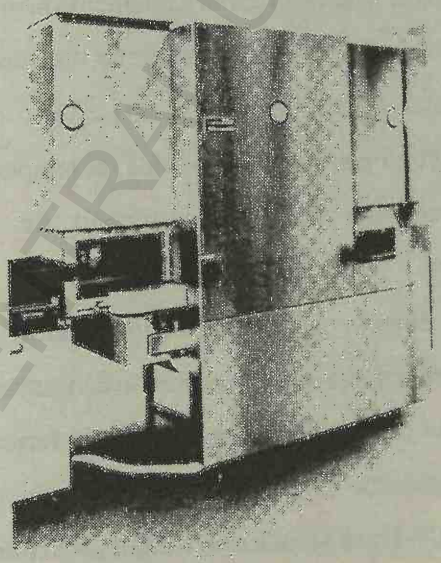


Fig.22.4 Tunel de sterilizare (pentru sterilizarea şi depirogenarea obiectelor din sticlă)

Sterilizarea se face la trecerea prin zona cu temperatură înaltă (250-300^{0}C), timp de mai multe minute.

Produsele de sterilizat sunt introduse în containere închise pentru a asigura menținerea sterilității post-sterilizare. Obiectele pregătite pentru sterilizare sunt amplasate astfel încât să

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

permită circulația aerului. Variațiile de temperatură din cameră nu trebuie să depășească $\pm 5^0$C față de temperatura maximă de sterilizare. Timpul de sterilizare, poate fi peste 4 ore în cazul obiectelor rău conducătoare de căldură. După sterilizare, obiectele se scot când temperatura a coborât la 40^0C; răcirea poate fi accelerată prin utilizarea unui curent de aer rece trecut peste filtru.

Sterilizarea cu gaz

Oxidul de etilen şi formaldehida au spectru larg de activitate biocidă şi sunt utilizate pentru sterilizarea instrumentelor chirurgicale, a unor echipamente medicale electrice şi de diagnostic, a pulberilor.

Sterilizarea cu oxid de etilen, utilizată mai frecvent decât formaldehida este considerată o alternativă a sterilizării cu radiații, în cazul materialelor medicale dispozabile. Această metodă nu asigură o garanție a sterilizării similară cu cea oferită de sterilizarea prin căldură şi de aceea este rezervată pentru produsele termo-sensibile.

Oxidul de etilen, în amestec cu aerul, este inflamabil şi de aceea se foloseşte combinat cu un gaz inert. (ex. bioxid de carbon).

Aceste două gaze acționează asupra microorganismelor prin alchilarea grupărilor sulfhidril, amino, hidroxil şi carboxil a proteinelor şi grupărilor imino ale acizilor nucleici. Concentrațiile de gaz (greutatea gazului per unitatea de volum a încăperii) este în mod obişnuit de 800-1200mg/l pentru oxidul de etilen şi 15-100mg/l pentru formaldehidă, la temperaturi de 45-63^0C, respectiv 70-75^0C. La temperaturi şi concentrații mai mari procesul de sterilizare este de durată şi necorespunzător pentru sterilizare.

Ca agenți de alchilare, ambele gaze au potențial cancerigen şi mutagen; pot produce simptome de intoxicație acută, cu iritarea tegumentului, a conjunctivei şi mucoasei nazale. Pentru protecția personalului este necesar controlul concentrației atmosferice.

Oxidul de etilen pătrunde uşor în materialele plastice şi cauciuc şi formează mai greu polimeri care pot bloca conductele. Dacă se măreşte timpul de expunere, sterilizarea poate avea loc la temperatura camerei. Posibilitatea degradării produselor în procesul de sterilizare este foarte redusă.Pentru ca sterilizarea cu oxidul de etilen să fie eficientă este necesară prezența unei umidități minime în jurul produsuluii (30-70%).

Sterilizatorul cu oxid de etilen constă dintr-o cameră de oțel cu perete dublu prin care circulă apă caldă pentru a uniformiza temperatura din incintă. Aerul din cameră trebuie evacuat, iar umidificarea se realizează cu abur, la presiune scăzută.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Materialele ambalate trebuie să fie permeabile pentru aer, vapori şi gaz. După tratament, gazul este evacuat direct în atmosferă sau printr-un sistem special de evacuare. Procesul de sterilizare este dirijat şi controlat automat. Articolele sterilizate sunt scoase din cameră şi amplasate pentru resorbţie în condiţii care permit ca gazul rezidual sau produşii de transformare ai acestuia în produsul sterilizat să atingă concentraţii inferioare celor care ar putea produce efecte toxice în cursul folosirii produsului.

Formaldehida

Aldehidele acţionează prin alchilare. Expunerea bacteriilor la concentraţii scăzute de formaldehidă duce la acumularea acidului 1,3 tiazin-4-carboxilic, inhibitor al formării de metionină.

Formaldehida în formă gazoasă se obţine prin încălzirea formalinei (soluţie apoasă de formaldehidă 37% m/v) la temperatura de 70-75^{0}C cu aburi. Formaldehida este mai puţin periculoasă deoarece nu este inflamabilă şi este uşor detectabilă prin miros. Dezavantajul major constă în faprul că formaldehida are o putere mică de penetrare; materialele de ambalaj care pot fi utilizate sunt hârtia şi ţesăturile din bumbac. Gazul este iritant pentru ochi, nas şi tegument. Acţiunea asupra bacteriilor este bacteriostatică; creşterea este inhibată la concentraţii de 20µg/ml. Soluţiile mai concentrate (20% formalină) sunt bactericide, tuberculocide, fungicide şi inactivează numeroase virusuri. Acţiunea germicidă este amplificată prin asocierea cu alcool: 20% formalină în alcool 70%, este un amestec utilizat pentru dezinfecţia instrumentelor de metal.

Sterilizarea cu radiaţii

Principalele tipuri de radiaţii utilizate pentru sterilizarea produselor farmaceutice şi medicale sunt electronii accelerați, radiaţiile gamma şi razele ultraviolete (ambele radiaţii electromagnetice). Tinta radiaţiilor este ADN microbian care este degradat; urmarea este moartea celulei sau refacerea porţiunilor distruse, în cazul microorganismelor rezistente la radiaţii. In cazul razelor ionizante (raze gamma şi electroni accelerați) rezistenţa microbiană scade în prezenţa umezelii sau a oxigenului solvit şi la temperaturi ridicate.

Sterilizarea cu radiaţii se aplică industrial, produselor termo-sensibile. Totuşi în preparatele apoase au loc modificări nedorite (radioliza apei) iar materialele din plastic folosite ca ambalaje sau piese medicale sunt deteriorate. Sterilizarea cu radiaţii se aplică materialelor în stare uscată: instrumentar medical, proteze, unguente unidoze, seringi din plastic, produse farmaceutice uscate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Radiațiile ultraviolete au energia mai redusă şi produc modificări mai mici ale ADN microbian. Puterea lor de penetrare este scăzută, în cazul produselor ambalate şi ca urmare nu sunt indicate pentru sterilizarea formelor farmaceutice dozate. Sunt utilizate pentru sterilizarea aerului, a suprafețelor din zonele de lucru aseptic şi pentru tratarea apei.

Sterilizatorul cu radiațuii gamma

Razele gamma pentru sterilizare sunt obținute prin dezintegrarea cobaltului-60 (se mai poate utiliza şi cesiu-137). Izotopul se prezintă sub formă de granule ambalate în tuburi metalice. Din motive de securitate sursa este închisă într-o încăpere cu pereții groşi de 2 m, scufundată într-un tanc cu apă.

Obiectele care trebuie sterilizate sunt trecute prin camera de sterilizare. Doza eliberată este dependentă de puterea sursei şi de perioada de expunere; de obicei durata de expunere este de 20 ore.

Acceleratoarele de electroni sunt de două tipuri: acceleratorul electrostatic şi acceleratorul linear cu microunde, care produc electroni cu energia maximă de 5MeV respectiv 10MeV. Energii mai mari ar asigura o penetrare mai bună în produs dar există riscul iradierii acestuia. Obiectele care urmează a fi sterilizate sunt în general mci şi amplasate într-un conveier orizontal. Doza de sterilizare este eliberată mult mai rapid în acceleratorul de electroni, decât în instalația cu cobalt-60: timpul de sterilizare este de câteva secunde sau minute.

Radiațiile ultraviolete au lungimea de undă de 260nm. Sursa este o lampă cu mercur. Operatorul prezent în camera de iradiere trebuie să posede un echipament de protecție adecvat şi ochelari. Acizii nucleici absorb UV în cantități de 10-20 ori mai mari decât alte proteine. Alterarea unui singur acid nucleic, adesea a unei gene, duce la moartea bacteriei sau are efect mutagen. UV nu pătrund uşor în diverse materiale, deoarece energia lor este mică. Sticla obişnuită, cu grosimea mai mare de 1mm este practic opacă pentru radiațiile ultraviolete. Datorită permeabilității scăzute, razele UV sunt indicate pentru sterilizarea şi dezinfecția aerului, suprafețelor şi apei.

Sterilizarea prin filtrare

Filtrarea este singurul proces de sterilizare în care microorganismele sunt îndepărtate din produs fără a fi omorâte. Metoda, care previne pasajul formelor viabile sau moarte este utilizată pentru clarificarea şi sterilizarea lichidelor şi gazelor.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sterilizarea prin filtrare se aplică în cazul soluțiilor injectabile sau oftalmice, produselor biologice, aerului şi altor gaze care ajung în zonele de lucru aseptic.

Membranele flitrante au rol important în testele de sterilitate, utilizate pentru reținerea microorganismelor contaminante din soluțiile testate. Aceste filtre sunt apoi plasate pe suprafața unui mediu nutritiv solid şi incubate pentru a urmări creşterea microorganismelor.

Mecanismul filtrării constă în cernerea, adsorbția şi reținerea pe materialul filtrului. Filtrele sunt confecționate din derivați de celuloză sau alte materiale polimerice, cu diametrul porilor de cel mult 0,22μm. Filtrele sau membranele filtrante nu trebuie să cedeze din componentele lor şi nici să interacționeze chimic sau fizic cu produsul de sterilizat.

Membranele filtrante sunt de unică utilizare sau, în cazul filtrelor industriale pot fi supuse unui număr mic de resterilizări.

Sterilizarea prin filtrarea gazelor se aplică mai ales pentru obținerea aerului steril în zonele de lucru aseptic.

Filtrele de aer cu înaltă eficiență (filtre HEPA – High Eficiency Particulate Air) pot reține 99,99% din particulele mai mari de 0,33μm în diametru. Aerul este trecut mai întâi peste un prefiltru pentru a reține particulele mari.

Filtrele se mai folosesc pentru sterilizarea aerului sau dispersarea aerului în țesuturi şi în culturile microbiologice, pentru decontaminarea aerului în ventilatoarele mecanice (filtre din fibre de sticlă, pentru tratarea aerului evacuat din boxele microbiologice.

In Tabelul 22.3 sunt prezentați parametrii de sterilizare a produselor farmaceutice şi medicale.

Tabel 22.3 Condițiile de sterilizare pentru produsele farmaceutice şi medicale

Metoda de steriliazare	Condiții
Căldura umedă (autoclavare)	121^0, 15 min. 134^0C, 3 min.
Căldura uscată	160^0C, 120 min. 170^0C, 60 min. 180^0C, 30 min.
Oxidul de etilen	Concentrația gazului: 800-1200 mg/l; 45-63^0C; 30-70% umiditate relativă; durata de sterilizare: 1-4 ore
Aburi cu temperatură scăzută şi formaldehidă	Concentrația gazului: 15-100 mg/l; abur cu temperatura de 73^0C; Timp de sterilizare: 40-180 min.
Iradiere: raze gamma sau electroni accelerați	Doza de 2,5 Mrad
Filtrarea	Dimensiunea porilor ≤ 0,22μ, membrane filtrante sterile

BUASM / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Procesul de sterilizare trebuie considerat ca un compromis între menținerea activității antimicrobiene nealterate şi a stabilității produsului.

Metodele de sterilizare trebuie validate prin utilizarea unor microorganisme corespunzătoare iar eficiența procesului trebuie verificată permanent. Sterilizarea trebuie considerată ca o etapă finală a programului de control microbiologic şi nu ca o alternativă a practicii bune de fabricație.

Bibliografie

Anderson NR. *Container cleaning and sterilisation.* In: Aseptic Pharmaceutical Manufacturing. Eds. Olson PW and Groves MJ, Interpharm Press, 11-62, 1990.

Beloian A. *Methods of testing for sterility and efficacy of sterilisers, sporicides and sterilising processes.* In: Disinfection, sterilisation and preservation. Ed. Block SS, 2nd edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 11, 1977.

Buiuc D. *Microbiologie* . Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 92-110, 1997.

European Pharmacopeia. Biological test. Sterility, 1997.

Ernst RR. *Ethylene Oxide Gaseous sterilisation for industrial applications.* In: Industrial Sterilisation, Eds. Phillips GB and Miller W, Duke University Press, Durham, NC, 78-99, 1972.

Jacobs GP. *Radiation in the sterilisation of pharmaceuticals.* In: Sterile Pharmaceutical Manufacturing, eds. Groves MJ, olson WP, Anisfeld WP, Interpharm Press v1, 57-78, 1990.

Nyström B. *New tehnology for sterilisation and disinfection.* Am J Med; 91: 264S-266S, 1991.

Pflug IJ. *Heat sterilisation.* In: Industrial sterilisation, eds. Phillips GB and Miller W, Duke University Press, Durham, NC. 239-281, 1972.

Silverman GJ, Sinskey AJ. *Sterilisation by ionizing irradiation.* In: Disinfection, sterilisation and preservation. Ed. Block SS, 2nd Edition, Lea and Febiger, Philadelphia: 546-547, 1977.

United States Pharmacopeia. USP – 23. Sterility tests. 1686-1690, 1995.

Vesley V, Langholz AC, Rohlfing SR, Foltz WE. *Fluorimetric detection of a Bacillus stearothermophilus spore-bound enzyme, alpha-beta glucosidase for rapid indication of flash sterilisation failure.* Appl Environ Microbial; 58: 717-719, 1992.

Wingard LB, Brody TM, Larner J, Schwartz A. *Human Pharmacology.* Ed. Mosby, 757-764, 1991.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23

Controlul sterilizării şi asigurarea sterilității

Un produs este steril dacă este lipsit de microorganisme vii. Calitatea microbiologică este asigurată prin asocierea proceselor de monitorizare cu criteriile de performanță.

Determinarea încărcării microbiene

Încărcarea microbiană se referă la numărul total de microorganisme per gram sau mililitru şi tipul lor: bacterii, drojdii, mucegaiuri.

Încărcarea microbiană este determinată începând cu materiile prime, pentru a confirma că materialul corespunde normativelor; nivelul maxim de contaminanți admis este cel specificat în diversele farmacopei sau cel stabilit de producător în timpul procesului de fabricație.

Nivelul sterilității care este asigurat în procesul de sterilizare depinde de programul procesului de sterilizare şi de încărcarea microbiană imediat anterioară sterilizării.

Adoptarea unor standarde înalte privind calitatea materiilor prime nu este o strategie care să asigure că produsul are o încărcare microbiană redusă imediat înainte de sterilizare. Este necesar să existe siguranța că speciile oportuniste contaminante sunt limitate pe parcursul etapelor de producție şi acele microorganisme care sunt prezente nu vor găsi condiții de multiplicare. Aceasta presupune că procesul de producție se va desfăşura în condiții de temperatură, pH, expunere la solvenți organici, care să prevină creşterea numărului de microorganisme. Apa, de exemplu, este cea mai comună sursă de contaminare a produselor şi menținerea apei la temperaturi ridicate limitează creşterea unor microorganisme cum ar fi *Pseudomonas spp*. Utilizarea ca materii prime a unor compuşi de sinteză chimică în locul celor de origine vegetală sau animală, este un alt mod de limitare a încărcării microbiene.

Supravegherea mediului

Urmărirea încărcării microbiene în spațiile de producție are ca scop confirmarea ca numărul de microorganisme nu depăşeşte limitele admise. Concentrația bacteriilor, ciupercilor sau

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mucegaiurilor din atmosferă se face prin metoda plăcilor deschise (plăci Petri cu mediu corespunzător expuse un anumit timp, în care, după incubare, se numără coloniile), sau prin utilizarea unui dispozitiv care permite trecerea unui volum cunoscut de aer peste suprafața unui mediu agarizat.

Contaminarea suprafețelor şi a echipamentului de producție poate fi măsurată utilizând tampoane sau plăci de contact (plăci Petri speciale), cu agar, care când este turnat umplu complet placa. Aceasta permite ca placa să fie aplicată pe orice suprafață, mod în care are loc transferul microorganismelor pe agar.

Controlul se extinde şi asupra operatorilor din zona de producție; trebuie verificate hainele de protecție, mănuşile, măştile pentru a evalua numărul şi tipul de microorganisme care ar putea ajunge în produse din aceste surse.

Controlul sterilizării

Monitorizarea procesului de sterilizare se asigură prin indicatori fizici chimici şi biologici, care adesea sunt utilizați în asociere.

Indicatorii fizici

Informațiile privind pătrunderea căldurii şi distribuția în sterilizator sunt furnizate de termocupluri plasate în anumite locuri ale incintei de sterilizare sau direct pe ambalaje test sau flacoane. Verificarea presiunii aburului se face prin teste periodice, pentru a urmări eficiența eliminării aerului, înaintea introducerii aburului.

Sterilizarea cu gaze este monitorizată prin măsurarea temperaturii, presiunii şi umidității. Concentrația gazului este evaluată funcție de masa de gaz utilizată.

Sterilizarea cu radiații se controlează prin utilizarea unui dozimetru de plastic (adesea plexiglas) care se înnegreşte treptat, proporțional cu radiațiile adsorbite; radiațiile sunt evaluate exact iar metoda este considerată cea mai bună pentru procesul de radiosterilizare.

Sterilizarea prin filtrare se verifică prin testul presiunii de saturație, tehnică prin care se determină mărimea porilor filtrelor şi integritatea acestora imediat după filtrare.

Eficiența filtrelor HEPA (*High efficiency particulate air*) utilizate pentru sterilizarea spațiilor de lucru aseptic, este verificată prin generarea unui contracurent de particule de dietilftalat sau clorură de sodiu, cu dimensiunea cunoscută, după care sunt detectate în curentul de aer filtrat. Eficiența retenției este raportată la procentul particulelor care au trecut prin filtru.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Indicatorii chimici

Controlul chimic al sterilizării se bazează pe capacitatea căldurii, aburului, gazelor sterilizante şi radiaţiilor ionizante de a modifica caracteristicile chimice şi/sau fizice ale unor substanţe chimice. Un indicator ideal ar trebui să se modifice numai când au fost atinse condiţii satisfăcătoare de sterilizare şi care confirmă că ciclul de sterilizare a fost complet. În practică însă nu există un indicator ideal şi trebuie făcută distincţia între: a). indicatorii chimici care includ mai mulţi parametri de sterilizare (temperatură, timp, saturaţia vaporilor) şi sunt aproape ideali; b). indicatori care măsoară numai un parametru şi pot fi utilizaţi numai pentru a face distincţie între obiectele sterilizate şi cele nesterilizate.

Indicatorii chimici în general îşi modifică consistenţa sau culoarea, relaţia între aceste modificări şi procesul de sterilizare fiind influenţată de forma de prezentare a indicatorului test (Tabel 23.1). Totuşi trebuie menţionat că modificările nu corespund neapărat cu sterilitatea microbiologică, şi ca urmare aceste produse nu trebuie folosite ca indicatori unici ai procesului de sterilizare.

Când sunt incluşi în locuri strategice în containere sau ambalaje, indicatorii chimici sunt singurii care monitorizează condiţiile din locurile mai puţin accesibile sau mai reci ale sterilizatorului.

Indicatorii biologici

Pentru controlul sterilizării termice, chimice şi cu radiaţii se utilizează ca indicatori biologici preparate standardizate de spori bacterieni, sub formă de suspensii în apă sau mediu de cultură, sau amplasate şi uscate pe suporturi de hârtie, aluminiu sau plastic.

Aceşti indicatori sunt plasaţi în sterilizator în locuri strategice. După sterilizare suspensiile apoase sau materialele impregnate cu spori sunt transferate aseptic, pe un mediu nutritiv adecvat care este incubat şi examinat periodic pentru a urmări eventuala creştere. Pentru controlul sterilizării cu vapori sub presiune se utilizează spori de *Bacillus stearothermophilus*, în fiole închise, cu mediu de cultură, care sunt incubate la 55^0 C. Un alt indicator biologic disponibil este *Biological indicator 1291* ® care conţine mai puţin de 10^5 spori de *B. stearothermophilus*. Mediul de cultură, închis într-o fiolă, conţine un substrat neofluorescent, care devine fluorescent după o oră de incubare la 56^0C în prezenta unei enzime specifice prezente în sporii de *B. stearothermophilus*. Speciile bacteriene utilizate ca indicator biologic trebuie să fie nepatogene; rezistenţa la temperatură a sporilor este evaluată după curba de distrugere obţinută prin expunere la procesul de sterilizare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 23.1 Indicatori chimici utilizaţi pentru controlul proceselor de sterilizare

Metoda de sterilizare	Principiu	Instrument de verificare	Parametrii controlaţi
Căldură Autocalvare sau căldură uscată	Soluţii colorate termo-sensibile	Tuburi închise umplute parţial cu o soluţie care îşi schimbă culoarea la temperaturi ridicate; gradul de modificare a culorii este proporţional cu temperatura; ex. tuburi Browne.	Temperatura, timpul
Căldură uscată	Compuşi chimici termo-sensibili	Obişnuit ceara albă sensibilă la temperatura care acoperă o suprafaţă marcată cu negru sau tipărită (hârtie); la o anumită temperatură ceara se topeşte rapid expunând marginile negre.	Temperatura
Căldură umedă în autoclav	Compuşi chimici termo-sensibili	Compuşi organici incluşi în cerneală impregnată pe un suport. Combinaţia cu umezeală şi căldură produc înnegrirea cernelii.	Saturaţia vaporilor
	Principiul capilarului (Thermalog S)	Constă într-o sferă de ceară, colorată albastru al cărei punct de topire este coborât în prezenţa căldurii umede. La autoclav şi în prezenţa aburului ceara se topeşte şi curge de-a lungul unei benzi de hârtie formând o bandă albastră cu lungimea proporţională cu temperatura şi timpul de expunere.	Temperatura, saturaţia vaporilor, timpul
Sterilizarea cu gaze Oxid de etilen (OE)	Reactivi chimici	Hârtie indicatoare impregnată cu un reactiv chimic care îşi modifică culoarea prin reacţie cu OE în prezenţa căldurii şi umezelii. Gradele de colorare depind de temperatură şi concentraţia OE	
	Principiul capilarului (Thermalog S)	Se bazează pe migrare ca şi în cazul Thermalog S.	
Abur cu temperatură scăzută şi formaldehidă	Reactivi chimici	Hârtie indicator impregnată cu reactiv chimic sensibil la temperaturi şi formaldehidă, care îşi modifică culoarea pe durata sterilizării.	Concentraţia de gaz, temperatura, timpul
Sterilizarea cu radiaţii	Compuşi chimici radiocromici	Dispozitive din plastic impregnate cu substanţe radiosensibile care îşi modifică culoarea la doze relativ mici de radiaţii	Indică numai expunerea la radiaţii
	Dispozitiv de dozare	Soluţii de sulfat feriamoniacal sau sulfat de ceriu îşi modifică densitatea optică funcţie de doza de iradiare	Măsoară cu precizie dozele de iradiere

În Tabelul 23.2 sunt prezentaţi sporii recomandaţi pentru verificarea sterilizării şi timpul de reducere decimală (timpul necesar ca 90% din spori să fie distruşi la temperatura aleasă de sterilizare sau la doza de radiaţii aleasă).

Sterilizarea prin filtrare se verifică prin teste care măsoară abilitatea filtrului de a reţine toate microorganismele din suspensia unui microorganism test. În acest scop se foloseşte *Serratia marcescens*, bacterie cu dimensiunea de aproximativ 0,5 μm, recomandată de *Pharmaceutical Codex (1979).*

Pentru membranele filtrante testul cu *Serratia marcescens* este utilizat în cazul filtrelor cu dimensiunea porilor de 0,45 μm; un test mai riguros este aplicat filtrelor cu dimensiunea de

0,22μm; în acest caz se utilizează o bacterie cu dimensiunea minimă de 0,3 μm – *Brevundimonas diminuta* (denumită anterior *Pseudomonas diminuta*). În test se utilizează un inoculum cu densitatea de 10^7 celule/ml.

Tabel 23.2 Indicatorii biologici utilizați pentru controlul proceselor de sterilizare

Proces de sterilizare	Specia	Mărimea inoculului	Valoarea D
Căldura în autoclav (121^0 C)	*Bacillus stearotheomophilus* *Clostridium sporogenes*	$> 10^5$ $> 10^5$	1,5 min 0,8 min
Căldura uscată (160^0 C)	*Bacillus subtilis var. niger*	$> 10^5$	5 – 10 min
Oxid de etilen (EO) (OE 600 mg/l, temp. de 54^0 C şi 60% umiditate relativă	*Bacillus subtilis var. niger*	$> 10^5$	2,5 min
Abur cu temperatură joasă (73^0 C) şi formaldehidă (12mg/l)	*Bacillus stearotheomophilus*	-	5 min
Radiații ionizante	*Bacillus pumilus*	10^7 - 10^8	0,3 nrad

Teste de sterilitate

Testele de sterilitate au drept scop verificarea absenței microorganismelor din produsele farmaceutice sterile sau de pe produsele medicale, prin incubarea întregului produs sau a unei părți din acesta în mediu nutritiv.

Testele de sterilitate, care urmăresc să evidențieze prezența microorganismelor viabile, pot da rezultate false, dacă nu sunt folosite medii de cultură adecvate. Pentru a avea certitudinea că microorganismele sunt absente, este necesară utilizarea unui mediu de cultură universal care să asigure creşterea oricărui posibil contaminant şi proba să fie incubată în diferite condiții.

În practică se utilizează numai medii care asigură creşterea bacteriilor nepretențioase, a drojdiilor şi mucegaiurilor.

Metode

1. Inocularea directă a probei în mediu nutritiv de cultură. British Pharmacopeea (1993), European Phamacopeea, (1997) şi United States Pharmacopeia – 23 (1995) recomandă două medii: 1). mediu lichid cu mercaptoacetat, care conține glucoză şi mercaptoacetat de sodiu şi este indicat mai ales pentru creşterea microorganismelor anaerobe (temperatura de incubare: 30-35^0 C; 2).

PGU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mediu cu extract de caseină din soia, care favorizează cultivarea bacteriilor aerobe şi anaerobe, incubate la 30 – 35^0 C precum şi a fungilor (incubate la 20 – 25^0 C), nu mai puţin de 7 zile.

2. *Filtrarea prin membrană* este preferată pentru produsele apoase alcoolice , uleioase sau pentru preparatele miscibile sau solubile în apă ori solvenţi care nu au efect antimicrobian în condiţiile testului.

Membranele filtrante utilizate au dimensiunea porilor ≤ 0,4 μm, astfel că orice microorganism prezent este reţinut pe suprafaţa filtrului. După spălarea in situ, filtrul este fragmentat aseptic şi porţiuni sunt transferate pe medii de cultură adecvate şi incubate la temperaturi şi perioade corespunzătoare.

3.O metodă sensibilă pentru detectarea nivelurilor scăzute de contaminare a soluţiilor intravenoase constă în adiţionarea unui mediu de cultură concentrat lichid în recipientul original; în acest mod este verificat întregul conţinut al probei.

Pentru a preveni contaminarea accindentală, testele trebuie efectuate în condiţii de strictă asepsie (de exemplu în boxe cu aer laminar).

Agenţii antimicrobieni

Activitatea agenţilor antimicrobienei incluşi în produsele farmaceutice, de exmplu ca prezervanţi, îşi pot pierde activitatea în timpul testelor de sterilitate încât nu mai pot preveni creşterea microorganismelor contaminante.

Inactivarea specifică

Un agent de inactivare (neutralizare) specific este încorporat în mediul de cultură; acest agent trebuie să fie netoxic pentru microorganisme.

Astfel antibioticele beta-lactamice pot fi inactivate de beta-lactamze, produse de numeroase specii Gram pozitive şi negative; cloramfenicolul este inactivat de acetiltransferaze; alte enzime (acetilaze, fosforilaze, adenilaze) modifică aminoglicozidele (Tabel 23.3).

Diluţia. Agenţii antimicrobieni diluaţi în mediu până la un anumit nivel îşi pierd orice activitate (ex. fenolii, cresolii, alcoolii). Metoda se aplică substantelor care au un coeficient η de diluţie mare.

Filtrarea prin membrană este utilizată pentru antibioticele şi agenţii de prezervare care nu pot fi inactivaţi cu alţi agenţi. Soluţia produsului este filtrată peste o membrană de filtru hidrofobă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care reține orice microorganism. Membrana este spălată in situ pentru a îndepărta orice urmă de antibiotic şi transferată într-un mediu de cultură adecvat.

Tabel 23.3 Agenți de inactivare

Agent inhibitor	Agent de inactivare
Fenoli	Niciunul (diluția)
Alcooli	Niciunul (diluția)
Parabene	Diluția şi Tween
Compuşi de mercur	Compuşi cu radical –SH
Compuşi de amoniu quaternar	Lecitină + Lubrol W Lecitină + Tween
Benzilpenicilina	Beta – lactamaze produse de *Bacillus cereus*
Ampicilina	
Alte antibiotice	Niciunul (filtrare prin membrană)
Sulfonamide	Acid p - aminobenzoic

Martorul pozitiv este utilizat pentru a verifica dacă microorganismele cresc în condițiile de desfăşurare a testului. Microorganismele utilizate pentru controlul pozitiv al testelor trebuie să fie sensibile la agentul antimicrobian prezent în produs încât creşterea microorganismelor indică o inactivare satisfăcătoare (prin diluția sau eliminarea agentului). Pentru controlul testelor, European Pharmacopeea (1997) recomandă următoarele microorganisme test: *Staphylococcus aureus ATCC 6538P, NCTC 7447; Bacillus subtilis, ATCC 6633; Clostridium sporogenes ATCC 19404; Candida albicans ATCC 2091*, pentru bacteriile aerobe, anaerobe şi fungi.

Analiza probelor

Testul de sterilitate confirmă dacă o parte a lotului examinat este steril sau nesteril şi aceasta se exprimă statistic.

Presupunând că p reprezintă proporția containerelor contaminate dintr-un lot şi q este proporția containerelor necontaminate, atunci $p + q = 1$ sau $q = 1 - p$.

Dacă presupunem de asemenea că o probă din două este luată dintr-un lot mare, care conține 10% containere contaminate, atunci probabilitatea ca flaconul luat la întâmplare să fie contaminat este $p = 0,1$ (10% = 0,1) în timp ce probabilitatea ca flaconul să fie neinfectat este $q = 1 - p = 0,9$.

Probabilitatea ca amândouă să fie infectate este $p^2 = 0,01$ şi ca amândouă să fie neinfectate este $q^2 = (1 - p)^2 = 0,81$.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Probabilitatea de a obține unul infectat și altul neinfectat este $1 - (0,01 + 0,81) = 0,18 = 2pq$.

În testele de sterilitate care includ probe din n containere, probabilitatea p de obținere a n probe sterile consecutive este : $q^n = (1 - p)^n$. În Tabel 23.4 sunt prezentate valori pentru diferite niveluri p, cu un număr constant de probe; testul nu poate detecta nivelurile mici de contaminare. Similar, dacă se utilizează numere diferite de probe, pe măsură ce numărul crește, probabilitatea ca numărul șarjelor considerate sterile scade.

Tabel 23.4 Analiza probelor în testele de sterilitate

	Probele infectate în șarjă (%)					
	0,1	1	5	10	20	50
p	0,001	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5
q	0,999	0,99	0,95	0,9	0,8	0,5
Probabilitatea P, pentru 20 probe sterile prelevate:						
Primul test de sterilitate[1]	0,98	0,82	0,36	0,12	0,012	< 0,00001
Primul retest[2]	0,99	0,99	0,84	0,58	0,11	0,002

1 – Calculat pentru $p = (1 - p)^{20} = q^{20}$ 2 – Calculat pentru $p = (1 - p)^{20} [2 - (1 - p)^{20}]$

Dacă se produce o contaminare accidentală pe durata executării testului de sterilitate, testul trebuie repetat. Sunt aplicate o serie de reguli:

1. Dacă creșterea este absentă, șarja trece de test;
2. Dacă creșterea este pozitivă, dar se identifică un alt microorganism decât cel anticipat, testul se repetă cu trei probe din fiecare șarjă;
3. Dacă în aceste probe creșterea este absentă, șarja trece de testul de sterilitate, dacă este prezentă creșterea oricărui microorganism, șarja este considerată nesterilă. Totuși testele adiționale cresc șansa ca să treacă o șarjă care conține un număr de containere infectate. Aceasta se deduce după formula: $(1 - p)^n [2 - (1 - p)^n]$, care indică șansa ca în primul retest să treacă o șarjă care conține o proporție p de containere infectate.

Bibliografie

Anderson NR. *Container cleaning and sterilisation.* In: Aseptic Pharmaceutical Manufacturing. Eds. Olson PW and Groves MJ, Interpharm Press, 11-62, 1990.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Beloian A. *Methods of testing for sterility and efficacy of sterilisers, sporicides and sterilising processes.* In: Disinfection, sterilisation and preservation. Ed. Block SS, 2nd edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 11, 1977.

Buiuc D. *Microbiologie* . Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 92-110, 1997.

European Pharmacopeia. Biological test. Sterility, 1997.

Ernst RR. *Ethylene Oxide Gaseous sterilisation for industrial applications.* In: Industrial Sterilisation, Eds. Phillips GB and Miller W, Duke University Press, Durham, NC, 78-99, 1972.

Jacobs GP. *Radiation in the sterilisation of pharmaceuticals.* In: Sterile Pharmaceutical Manufacturing, eds. Groves MJ, olson WP, Anisfeld WP, Interpharm Press v1, 57-78, 1990.

Nyström B. *New tehnology for sterilisation and disinfection.* Am J Med; 91: 264S-266S, 1991.

Pflug IJ. *Heat sterilisation.* In: Industrial sterilisation, eds. Phillips GB and Miller W, Duke University Press, Durham, NC. 239-281, 1972.

Silverman GJ, Sinskey AJ. *Sterilisation by ionizing irradiation.* In: Disinfection, sterilisation and preservation. Ed. Block SS, 2nd Edition, Lea and Febiger, Philadelphia: 546-547, 1977.

United States Pharmacopeia. USP – 23. Sterility tests. 1686-1690, 1995.

Vesley V, Langholz AC, Rohlfing SR, Foltz WE. *Fluorimetric detection of a Bacillus stearothermophilus spore-bound enzyme, alpha-beta glucosidase for rapid indication of flash sterilisation failure.* Appl Environ Microbial; 58: 717-719, 1992.

Wingard LB, Brody TM, Larner J, Schwartz A. *Human Pharmacology.* Ed. Mosby, 757-764, 1991.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

24

Aplicații ale microorganismelor în domeniul științelor farmaceutice

În domeniul practicii medicale şi farmaceutice a existat timp îndelungat tendința de a privi microorganismele doar ca entități primejdioase care trebuie distruse.

Totuşi rolul microorganismelor şi a produşilor acestora, a devenit pregnant în diagnosticul, tratamentul şi prevenirea bolilor infecțioase.

În Europa Centrală şi America de Sud se cultivau fungi care se aplicau pe răni. În secolul al XIX-lea au apărut concepte privind antagonismul microbian. În experimentele sale Pasteur a demonstrat că *Bacillus anthracis* este inhibat de bacterii obişnuite, inoculate simultan pe acelaşi mediu de cultură. Unele infecții – difteria, tuberculoza, sifilisul erau tratate, prin contaminarea deliberată cu stafilococi, lactobacili, *Escherichia coli.* Virusurile bacteriene (bacteriofagi) au fost considerate ca potențiali agenți antimicrobieni, la începutul secolului nostru.Această idee nu a fost acceptată deoarece fagii pot transfera gene de rezistență la antibiotice.

Cea mai importantă şi extinsă aplicare a microorganismelor este în industria de antibiotice, vaccinuri şi în producerea de ADN recombinant. Alți produşi cu utilizare în medicină sunt obținuți din microorganisme: vitamine, aminoacizi, dextrani, enzime, agenți chelatori de fier.

Microorganismele au început să fie utilizate şi în alte domenii. Una dintre metodele de combatere biologică a microorganismelor fitopatogene se bazează pe utilizarea unor fungi (ex. *Trichoderma harzianus*) antagonişti ori fungi fitopatogeni. Boala "Crown Gall" (cancerul bacterian al plantelor) este produsă de *Agrobacterium tumefaciens* , bacterie patogenă care produce pierderi mari în agricultură. Boala poate fi combătută prin preinocularea plantelor cu bacteria *Agrobacterium radiobacter* care produce o bacteriocină cu rol inhibant pentru *A. tumefaciens.*

Toxinele cristalizate (cristale proteice care se formează în cursul sporogenezei) de la *Bacillus thuringiensis* au proprietăți insecticide şi sunt utilizate în combaterea a peste 140 specii de insecte dăunătoare pentru plante.

Acest patogen conține două toxine importante: δ – endotoxina activă, mai ales asupra larvelor de lepidoptere, printr-un mecanism prezentat în Fig.24.1, netoxică pentru om şi animale şi β – endotoxina, cu spectru de acțiune mult mai larg (Lepidoptere, Coleoptere, Diptere). Beta-endotoxina este o adeninnucleotidă care inhibă sinteza ARNm datorită interferenței cu

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

polimerazele. Produsul este toxic pentru mamifere. Utilizarea în combaterea dăunătorilor este neautorizată.

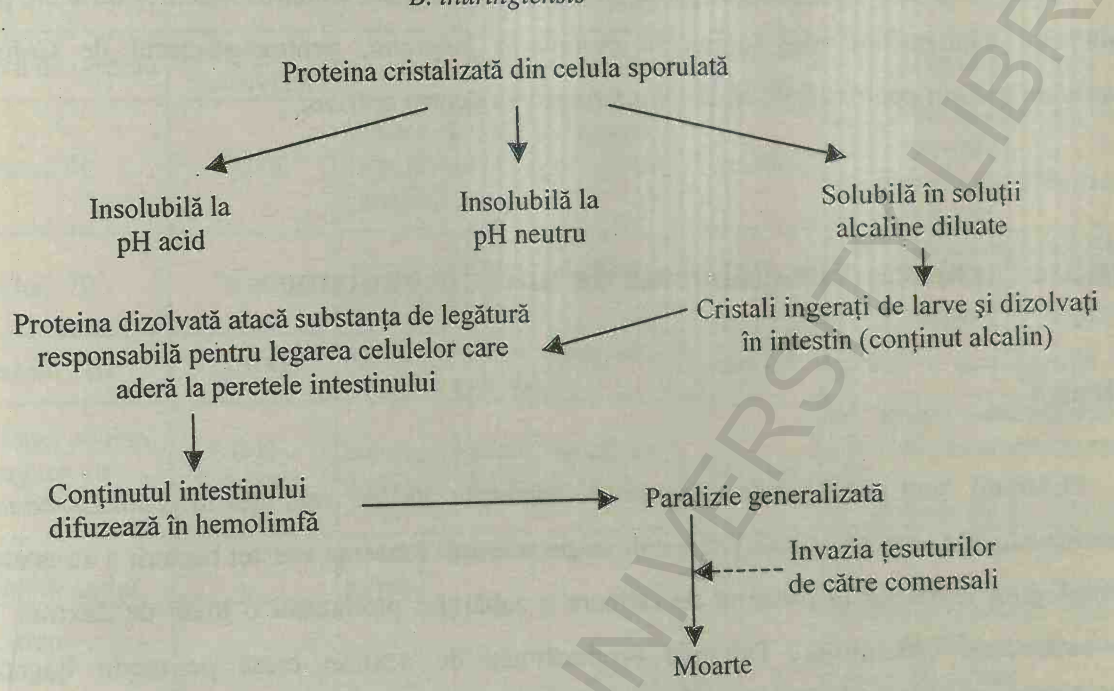


Fig.24.1 Mecanismul de acțiune al δ-endotoxinei obținute din *Bacillus thuringiensis*

Simptome și leziuni produse de δ-endotoxina. Primele simptome apar la câteva minute de la ingerarea cristalelor: larvele nu se mai pot hrăni datorită paraliziei mandibulei și a tubului digestiv. După 5-10 minute apar leziuni la nivelul microvilozităților intestinale, care devin mai scurte și mai rare. Urmează vacuolizarea și umflarea celulelor, modificarea membranelor celulelor adiacente și apariția de spații intercelulare, "umflarea" mitocondriilor, liza celulară. După 20-25 minute celulele se distrug prin șoc osmotic. Ionii și diferite substanțe trec din lumenul intestinal în hemolimfă, provocând paralizia și moartea larvelor.

Au fost izolate și tulpini *de B. sphaericus* patogene pentru larvele de *Anopheles* și *Culex*. Efectele toxice apar după 30 minute de la administare iar moartea survine în 4-6 ore. Este un larvicid ideal pentru mediile acvatice.

S-au făcut studii asupra eficienței toxinei botulinice în tratamentul paraliziei la copii. Toxina, produsă de *Clostridium botulinum* este o otravă puternică cu efect letal, dar este totodată și un relaxant muscular. Este utilizată în terapia strabismului, blefarospasmului și ale altor distonii, dovedindu-se eficientă și inofensivă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Studii recente au evidenţiat rolul citotoxinei produse de *Pseudomonas* în distrugerea celulelor tumorale. Toxina holerică acţionează ca un modulator imun şi ar putea fi utilizată ca agent terapeutic în terapia infecţiilor umane mediate imunologic.

Se cunosc peste 500 specii de fungi entomopatogeni, însă numărul speciilor utilizate pentru biocontrolul dăunătorilor este limitat la *Beauveria bassiana*, pentru gândacul de Colorado, *Verticillium becanii* pentru afide, *Hirsutella thompsonii* pentru acarieni.

Produse farmaceutice elaborate de microorganisme

Dextranii

Dextranii sunt polizaharide produse de bacteriile lactice mai ales în genul *Leuconostoc* (*L. dextranicus şi L. mesenteroides*) care cultivă pe sucroză. Prezenţa acestei bacterii a atras atenţia microbiologilor deoarece în procesul de rafinare a zahărului produceau o masă de dextran, care bloca conductele instalaţiilor. Tulpinile producătoare de dextran cresc pe medii bogate în carbohidraţi dar cu un conţinut scăzut de azot.

Grutatea moleculară a dextranului este variabilă (15 000 – 20 000 000) şi depinde de specia producătoare. Dextranul utilizat în scop medical trebuie să posede o anumită greutate moleculară.

Pentru obţinerea dextranilor cu o anumită greutate, se utilizează două metode: hidroliza acidă a polimerilor cu greutate moleculară mare şi utilizarea de dextrani cu greutate mică preformaţi care sunt adăugaţi în mediul de cultură.

Dextranii cu greutate moleculară corespunzătoare sunt obţinuţi prin precipitare cu solvenţi organici.Sunt utilizaţi ca substituienţi ai plasmei, administraţi intravenos pentru menţinerea sau restabilirea volumului sanguin. Aplicaţi pe arsuri sau leziuni, formează un strat hidrofilic care adsoarbe exudatele.

Dextranii utilizaţi ca înlocuitori ai plasmei au greutatea moleculară de 40 000 – 30 000. Polimerii cu greutate mică sunt eliminaţi renal rapid, iar cei cu greutatea maximă sunt periculoşi deoarece sunt reţinuţi în organism. În practică se utilizează în mod curent dextrani cu greutatea moleculară de 40 000, 70 000 şi 110 000.

În Tabel 24.1 sunt prezentate caracteristicile pentru diferite tipuri de dextrani.

Dextranul cu fier, injectabil este un complex de hidroxid de fier cu dextran a cărui greutate moleculară este de 5 000 – 7 000, utilizat în tratarea anemiilor. Sărurile de sodiu cu dextranul au

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

proprietăți anticoagulante comparabile cu ale heparinei și sunt formulate ca injecții pentru administrare intravenoasă.

Tabel 24.1 Utilizarea și proprietățile dextranilor

Tipul de dextran	Greutatea moleculară	Produs	Metoda de sterilizare	Utilizarea clinică
Dextran 40	40 000	10% m/v în 5% m/v, glucoză (injecții) sau 0,9% w/v NaCl (injecții)	Autoclav	Injecții IV, ameliorează circulația sanguină și funcția țesuturilor la arși și în cazuri de ischemie locală
Dextran 70	70 000	Injecții cu 6% m/v glucoză sau 0,9% m/v NaCl	Autoclav	Injecții IV pentru a echilibra volumul sanguin în condițiile piederii proteinelor plasmatice
Dextran 110	110 000	Injecții cu 6% m/v glucoză sau 0,9% m/v NaCl	Autoclav	Injecții IV, ca și dextran 70
Dextran cu fier, Complex cu clorură ferică	5 000 – 7 000	Soluție coloidală, injecții cu 0,9% m/v clorură de sodiu	Autoclav	IM: anemii, când terapia orală este ineficientă sau impracticabilă IV: (infuzie lentă): anemie
Dextran cu sulfat de sodiu		Pudră pentru prepararea soluției	Autoclav	Anticoagulant (soluție utilizată IV)
Dextrani reticulați		-	-	Insolubili în apă: în tehnici cromatografice pentru fracționare și purificare

Vitamine, aminoacizi, acizi organici

Vitamine

Vitamina B_2 (riboflavina) este un constituent al extractului de drojdii și este inclusă în muneroase preparate vitaminice.

Carența în vitamina B_2 se manifestă prin inflamarea limbii, dermatite și senzații de arsură a picioarelor. În cazurile grave de malnutriție simptomele sunt asociate cu manifestările cauzate de alte deficiente vitaminice.

În industrie, riboflavina este produsă de tulpini de fungi : *Eremothecium ashbyii* și *Ashbya gossypii* cultivați pe medii cu hidrolizat proteic.

În 1880, anemia perinioasă a fost prima oară, considerată boală fatală. Mai târziu, în 1926, s-a descoperit că prin consum de ficat crud, efectele bolii dispăreau.

Principiul activ a fost descoperit mai târziu și numit vitamina B_{12} (ciancobalamina). Inițial a fost obținută din ficat, dar în 1960 a fost obținută ca produs al activității metabolice microbiene (*Propionibacterium, Streptomyces griseus, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Mycobacterium smegmatis).*

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unii bacili intestinali (*Escherichia coli, Lactobacillus bifidus)* sau *Streptococcus faecalis* sintetizează vitamina K, iar alte specii ale microflorei intestinale sintetizează vitamina B_6, care intervine în reglarea metabolismului proteic, lipidic şi glucidic, care se reflectă în funcţionarea normală a organelor şi ţesuturilor. Vitamina H (biotina) este un factor esenţial pentru menţinerea proceselor metabolice la om, iar pentru numeroase bacterii este factor de creştere. Numeroase microorganisme sintetizează biotina: *Aspergillus, Penicillinum, Aerobacter aerogenes, Bacillus megatheri, Corynebacterium diphteriae, E. coli, Lactobacillus acidophilus, L. casei,* unele specii de *Pseudomonas*. Cantităţile de vitamină K, biotină, acid pantotenic, acid folic, acid paraaminobenzoic, produse de flora intestinală pot acoperi, parţial, necesităţile organismului (Tabel 24.2).

Tabel 24.2 Vitamine produse de microorganisme

Specia	B_1	B_2	B_6	Acid pantotenic	Biotina	Acid folic	Inozitol	PP
Pseudomonas fluorescens	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium butylicum	+	+	+	+	+	+	+	+
Aerobacter faecalis	0	+	0	+	0	0	0	+
Escherichia coli	+	+	0	0	+	0	0	+
Bacillus mesenthericus	+	++	0	0	0	0	0	+
Alcaligenes faecalis	+	+	0	0	+	0	0	+

Aminoacizii

Sunt incluşi în diverse soluţii utilizate pentru nutriţia paranterală sau sunt utilizaţi individual pentru terapie în anumite condiţii. Se obţin prin procese de fermentaţie sau din extracte celulare.

Aminoacizii necesari pentru sinteza proteinelor de către microorganisme pot fi găsiţi ca atare, în mediu sau pot fi sintetizaţi când în mediu există o sursă de azot. Microorganismele diferă în ceea ce priveşte capacitatea lor de a sintetiza aminoacizii. De exemplu, *Leuconostoc mesenteriodes* nu creşte decât dacă în mediu sunt prezenţi 16 aminoacizi diferiţi; în schimb *Escherichia coli* poate sintetiza toţi aminoacizii necesari pornind de la NH_3.

Glutamatul, lizina, care intră în componenţa soluţiilor perfuzabile, sunt produşi biosintetizaţi de *Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum*. Numeroase bacterii produc metionină, necesară creşterii şi menţinerii echilibrului azotat la adult.

Acizii organici

Acidul lactic şi acidul gluconic intră în componenţa unor produse farmaceutice dar sunt utilizaţi şi în industria chimică, alimentară.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acidul citric eliberat de *Aspergillus niger* este folosit ca produs de efervescență: citratul de sodiu este utilizat ca anticoagulant, iar citratul de potasiu, în tratarea cistitelor.

Lactobacillus delbrueckii, L. casei, Streptococcus lactis, Leuconostoc mesenteriodes, Escherichia coli, Rhizopus orizae, fermentează glucoza şi produc acid lactic.

Lactatul de calciu administrat oral este o sursă de Ca^{2+}, dar intră şi în componența soluțiilor de dializă intraperitoneală.

Gluconatul de calciu (obținut din acid glutamic, eliberat de specii cum ar fi *Gluconobacter suboxydans, Aspergillus niger*) este o sursă de Ca^{2+} (administrare orală).

Agenții chelatori de fier

Numeroase microorganisme pot creşte pe medii sărace în ioni de fier deoarece pot elibera în mediu agenți chelatori de fier, cu molecula mică (sideramine: ex. fericromi, ferioxamine) care au rol în preluarea ionilor de Fe. În ultimii ani aceşti compuşi sunt utilizați în medicină sub formă de preparate orale de sulfat feros pentru tratarea deficiențelor în fier. Administrarea trebuie supravegheată, deoarece sărurile de fier produc la copii intoxicații. O cantitate de aproximativ 3g sulfat feros consumată accidental de un copil determină acidoză, comă, tulburări cardiace şi alte simptome, care netratate au sfârşit letal. *Streptococcus pilosus* produce desferioxamina B (Desferal) forma retard a sideraminei, care este un antidot foarte eficient în tratamentul intoxicațiilor acute cu fier. Desferioxamina are afinitate foarte mare pentru ionii de fier iar complexul fier – desferioxamină solubil în apă este excretat rapid prin rinichi. În anemiile hemolitice (ex. talasemie), desferioxamina este utilizată în asociere cu transfuziile de sânge pentru a menține nivelul normal al hemoglobinei şi al ionilor de fier liberi.

Desferioxamina este condiționată ca o pulbere sterilă pentru administrare parenterală, dar poate fi administrată şi oral, în intoxicațiile acute cu fier, pentru a reține fierul neadsorbit din intestin. Cercetări recente au sugerat că sideraminele microbiene şi derivații lor semisintetici pot fi utilizați în chemoterapia antimicrobiană şi antitumorală. Sideraminele produse de *Paracoccus denitrificans* (parabactina şi compusul II) inhibă creşterea celulelor leucemice în cultură şi la animalele de experiment; totodată mai au şi capacitatea de a inhiba replicarea virusurilor cu ARN.

Enzimele

Numeroase enzime sunt utilizate în scopuri medicale.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Streptokinaza

Sângele coagulat al mamiferelor poate fi dizolvat sub acţiunea unei enzime proteolitice numită plasmină. Plasmina se găseşte în mod normal sub formă de precursor inactiv, plasminogen. Anumite tulpini de streptococi produc o substanţă care este capabilă să inactiveze plasminogenul. Această substanţă – streptokinaza – este utilizată în practica medicală pentru lichefierea cheagurilor sanguine (Tabel 24.3). Streptokinaza se administrează intravenos sau intraarterial în tratamentul tulburărilor trombo-embolice (ex. embolie pulmonară, tromboza venelor profunde, obstrucţii arteriale), în infarctul miocardic acut.

Tabel 24.3 Aplicaţii ale enzimelor în domeniul medical

Enzima	Sursa	Domenii de utilizare
Streptokinaza	Anumite tulpini de streptococi	Lichefiază cheagurile sanguine
Streptodornaza	Anumite tulpini de streptococi	Lichefiază puroiul
L-Asperaginaza	E. coli sau *Erwinia carotovora*	Chemoterapia cancerului
Neuraminidaza	*Vibrio cholerae*	Experimental amplifică imunogenicitatea celulelor tumorale
Beta-lactamaze	*Bacillus cereus* sau alte bacterii	Teste de sterilitate, inactivarea antibioticelor beta-lactamice
Enzime care modifică sau inactivează alte antibiotice	Bacterii rezistente la aminoglicozide, cloramfenicol	Teste de sterilitate
Glucozooxidaze	*Aspergillus niger*	Analiza glucozei sanguine

Streptodornaza, prezentă în filtratul culturilor de streptococi, lichefiază puroiul. Este o dezoxiribonuclează care rupe dezoxiribonucleoproteina şi ADN, care intră în componenţa puroiului şi reduc vâscozitatea acestuia.

Streptokinaza şi streptodornaza asociate sunt utilizate pentru drenajul prin lichefiere a cheagurilor de sânge şi/sau a puroiului din cavitatea toracică. Combinaţia poate fi utilizată local, în cazul plăgilor care supurează abundent.

Streptokinaza şi streptodornaza sunt izolate din mediul de cultură cu exces de glucoză a unor streptococi nepatogeni. Din filtratul brut, cele două enzime se separă relativ bine; comercializarea se face sub formă injectabilă, ca enzime separate sau asociate.

L-Asparaginaza, utilizată în terapia cancerului este produsă de *Escherichia coli* şi *Erwinia carotovora*. Anumite tumori utilizează aminoacidul L-asparagina şi enzima este administrată în scopul distrugerii celulelor tumorale care transformă asparagina în acidul aspartic şi amoniac. În terapia umană, L-asparaginaza este utilizată în tratamentul leucemiei limfoblastice şi uneori a leucemiei mieloide.

SOU "ASTI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Neuraminidaza, folosită experimental pentru creşterea imunogenicităţii celuleor tumorale este obţinută din *Vibrio chlerae*. Enzima elimină resturile de acid N-acetilneuraminic de pe suprafaţa externă a unor anumite celule tumorale, care expun noi antigene, concomitent cu creşterea imunogenicităţii. Cercetările au arătat că la pacienţii cu leucemie acută, tratamentul cu neuramidază asociată cu chemoterapia convenţională duce la creşterea ratei de remisie a tumorilor.

Beta-lactamazele, produse de numeroase bacterii Gram pozitive şi Gram negative, conferă rezistenţă la antibiotice betalactamice; aceste enzime, mediate cromosomal sau plasmidic, catalizează hidroliza nucleului beta-lactamic, cu inactivarea antibioticului.

Beta-lactamazele sunt utilizate în testele de sterilitate pentru anumite antibiotice, în inactivarea beta-lactaminelor din probele de sânge şi urină la pacienţii care au primit terapie cu aceşti agenţi.

O altă utilizare terapeutică importantă se referă la salvarea pacienţilor care prezintă simptome severe de alergie la beta-lactamine prin administrare intramusculară sau intravenoasă de penicilinază purificată, obţinută din *Bacillus cereus*, în paralel cu alţi agenţi cum ar fi adrenalina sau antihistaminice.

Utilizarea microorganismelor în sinteza produselor farmaceutice

Producerea de antibiotice

Din cele câteva mii de antibiotice descrise, mai mult de 70% sunt produse de microorrganisme, iar dintre acestea circa 60%, de actinomicete. Producerea prin fermentaţie, cu tulpina de *Penicillium chrysogenum* a penicilinei din care prin hidroliză, catalizată de penicilin acilază se obţine acid 6 – aminopenicililanic (utilizat pentru sinteza multor peniciline), a cefalosporinei C din care se prepară numeroase cefalosporine semisintetice, este deosebit de importantă pentru industria de antibiotice. In Tabelul 24.4 sunt prezentate o serie de microorganisme producătoare de antibiotice.

Biotransformarea steriozilor

Hormonii steroizi se obţin în cantităţi mici direct din ţesuturile animale; în cantităţi mai mari şi cu preţ scăzut se prepară din sterolii vegetali. Toţi steroizii adrenocorticoizi au în nucleul steroidic oxigen în poziţia 11; numeroase microorganisme pot realiza aceeaşi oxidare limitată şi specifică a steroizilor incluşi în mediul de cultură (Tabel 24.5). În 1952 a fost obţinut industrial 11-α

FCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

hidroxiprogesteron prin conversia progesteronului sub acțiunea fungului *Rhizopus nigricas* (Fig.24.2).

Tabel 24.4 Microorganisme producătoare de antibiotice

Familia	Antibiotic	Sursa
Beta-lactamine	Penicilina G Penicilina V Cefalosporina C Cefalotina Cefaloridina	*Penicillium notatum şi P. Chrysogenum* *Cephalosporium acremonium*
Oligozaharide	Streptomicina Neomicina Framicetina Paromomicina Kanamicina Gentamicina Tobramicina	*Streptomyces griseus* *S. fradiae* *S. Iavendulae* *S. rhimosus* *S. kanamyceticus* *Micromonospora monospores* *S. tenebrarius*
Tetracicline	Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	*S. texasi* *S. aureofaciens* *S. rimosus*
Cloramfenicol	Cloramfenicol	*S. venezuelae*
Macrolide	Eritromicina Oleandomicina Kitasamicina Lincomicina Spiramicina	*S. erythreus* *S. antibioticus* *S. kitasaensis* *S. lincolnensis* *S. ambofaciens*
Steroidice	Acid fusidic Pristinamicina	*Fusarium coccineum* *S. lavendulae*
Rifamicine	Rifamicina SV	*S. mediteraneis*
Polipeptide	Polimixina Bacitracina Tirotricina Cilcoserina Subtilina Colistine	*Bacillus polymyxa* *B. lichemformis* *B. brevis* *S. orhidaceus* *B. subtilis* *Aerobacillus colistinus*
Antifungice (polienice)	Amfotericina B Fumigalina Griseofulvina Nistatina	*Streptomyces M 1575* *Aspergillus fumigatus* *Penicillium patulum* *S. nourse*

Reacția este o etapă importantă în obținerea hidrocortizonului din steroizi accesibili.

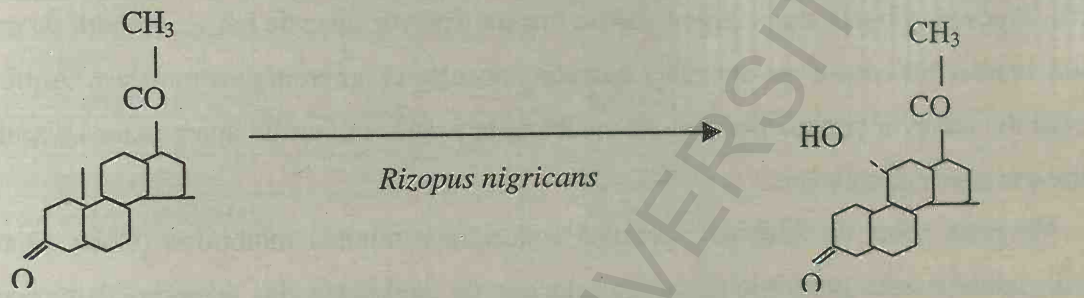
Recent în reacțiile de biotransformare microorganismele au fost înlocuite cu celule microbiene imobilizate (vii sau moarte) încorporate într-un gel de polimer. În acest fel se amplifică

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

stabilitatea enzimelor asociate membranelor, care sunt instabile în soluție și este posibilă conversia compușilor steroizi insolubili în apă într-un sistem bifazic apă – solvent organic.

Tabel 24.5 Biotransformarea compușilor steroizi

Substrat	Produs	Tipul reacției
Progesteron	11 α - hidroprogesteron	Hidroxilare
11 α - hidroprogesteron	Δ -11 α - hidroprogesteron	Dehidroxilare
Hidrocortizon	Prednisolon	Dehidroxilare
Cortizon	Prednisolon	Dehidroxilare



Progesteron

11 α - hidroxiprogesteron

Fig.24.2 Conversia progesteronului în 11α-hidroxi-progesteron sub acțiunea fungului *Rhizopus nigricans*

Inversia chirală

Unii agenți terapeutici (ex. salbutanol, propanolol, acizi 2 – arilpropionici) sunt utilizați în formă racemică. Dar ibuprofenul este activ numai sub formă de izomeri S(+).

Inversia chirală, unidirecțională R (-)→ S(+) are loc in vivo într-un interval de 3 ore. Formele S(+) sunt inhibitori deosebit de eficienți ai sintezei prostaglandinei și numeroase enzime fungice transformă amestecul racemic, in vitro, într-un izomer S(+). Astfel, forma pură S(+) poate fi administrată clinic pentru a reduce toxicitatea și doza.

Utilizarea microorganismelor și a produselor acestora în tehnicile de biodeterminare

Microorganismele sunt utilizate pentru:

1. Determinarea concentrației anumitor compuși (ex. vitamine, aminoacizi, antibiotice) în fluidele organismului sau în diverse amestecuri chimice;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Diagnosticarea anumitor boli;
3. Testarea potenţialului cancerigen şi mutagen al diferiţilor compuşi chimici;
4. Controlul proceselor în care se utilizează enzime imobilizate;
5. Teste pentru controlul sterilităţii antibioticelor.

Dozarea microbiologică a antibioticelor

Dozarea microbiologică se face în mod curent prin metoda difuziei în agar: antibioticul care difuzează în agar, inhibă creşterea populaţiei microbiene sensibile şi produce o zonă de inhibiţie a creşterii. Frecvent probele studiate sunt depuse într-un rezervor (disc de hârtie, cilindru de porţelan sau oţel inoxidabil), depus pe suprafaţa agarului inoculat cu microorganismul test. Antibioticul difuzează din rezervor şi după perioada de incubare, în jurul rezervorului apare o zonă circulară de inhibiţie a creşterii microbiene.

Marginea zonei de inhibiţie reprezintă concentraţia minimă inhibitorie (CMI). Diametrul zonei de inhibiţie este proporţional cu concentraţia de antibiotice din rezervor, dacă condiţiile standard în care are loc testarea rămân constante.

Dozarea vitaminelor şi a aminoacizilor

Dozarea vitaminelor şi aminoacizilor se bazează pe evidenţierea creşterii bacteriene. Mediul de cultură, adecvat pentru microorganismul test conţine toţi factorii esenţiali pentru creştere, cu excepţia aceluia care trebuie determinat. Dacă sunt adăugate concentraţii care variază între anumite limite, microorganismul test creşte proporţional cu cantitatea adăugată. Poate fi trasată curba concentraţiei substanţei care trebuie determinată, funcţie de unii parametri ai creşterii microbiene (ex. masa celulară uscată, densitatea optică, producerea de acid), (Fig.24.3).

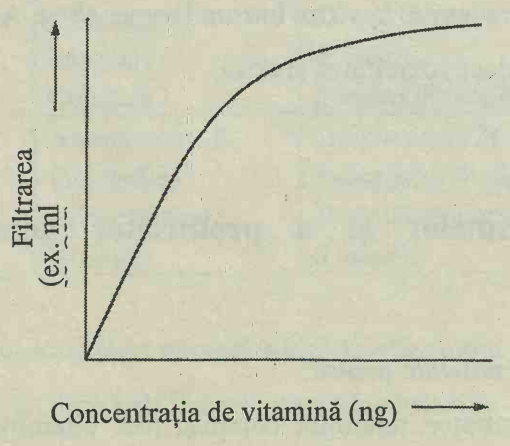


Fig.24.3 Curba standard pentru determinarea concentraţiei vitaminelor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Piridoxina (vitamina B_6) se dozează utilizând ca microorganism test un mutant piridoxin – dependent de *Neurospora*. În Tabel 24.6 sunt consemnate o serie de microorganisme test utilizate în dozarea vitaminelor sau a aminoacizilor.

Tabel 24.6 Microorganisme utilizate pentru dozarea de vitamine şi aminoacizi

Microorganismul test	Vitamina sau aminoacidul
Lactobacillus casei	Biotina
L. arabinosus	Pantotenat de calçiu
L. leichmannii	Ciancobalamina
L. casei	Acidul folic, roboflavina, piridoxal
L. arabinosus	Acid nicotinic
L. viridans	Tiamina
Saccharomyces uvarum	Inozitol
S. carlsbergiensis	Piridoxina
Neurospora crassa	Piridoxina
Acetobacter suboxydans	Pantotenol

În practică, numai vitaminele sunt dozate microbiologic, aminoacizii sunt în mod curent determinaţi prin metode chimice.

Testele pentru determinarea fenilcetonuriei

Fenilcetonuria este un defect metabolic care face ca organismul să nu poată converti excesul de fenilalanină în tirozină, utilizată de exemplu, pentru biosinteza de tiroxină, adrenalină şi noradernalină; acest defect poate fi controlat printr-un regim alimentar care conţine cantităţi reduse de fenilalanină.

Diagnosticul precoce este esenţial, deoarece neidentificarea acestei erori metabolice determină deficienţe mentale. Verificarea noilor născuţi se face prin testul Guthrie, care utilizează *Bacillus subtilis* ca microorganism test. Pe medii minimale, creşterea bacteriei este inhibată de β - 2 – tienilalanina şi creşte în prezenţa fenilalaninei. Discuri de hârtie impregnate cu probe de sânge sau urină permit detectarea unor niveluri mari de fenilalanină şi acid fenilpiruvic (rezultat în urma reacţiei dintre fenilalanină şi acidul α - cetoglutaric). Testul este cantitativ prin evaluarea diametrului zonei de creştere în jurul discului de hârtie şi comparat cu o curbă standard construită pe baza unor concentraţii cunoscute de fenilalanină sau acid fenilpiruvic.(Fig.24.4).

Teste pentru determinarea efectelor cancerigene sau mutagene

Substanţele cancerigene duc la apariţia unor tumori maligne iar mutagenii (chimici sau fizici) induc mutaţii în celulele organismelor. Mutaţiile pot avea loc la nivelul unei gene (mutaţie

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

punctiformă), la nivelul unui cromosom, sau a unui set de cromosomi.

Testul Ames, este utilizat pentru detectarea compuşilor chimici sau a agenţilor terapeutici cu potenţial cancerigen. Un număr mare de compuşi sunt testaţi pentru a depista abilitatea de a induce mutaţii în mutanţi bacterieni de *Salmonella typhimurium*. Tulpina test prezintă o mutaţie la nivelul operonului care controlează histidina, astfel că aceasta nu poate sintetiza aminoacidul histidină. Două mutaţii adiţionale cresc sensibilitatea sistemului: un defect în structura lipopolizaharidică şi această mutaţie creşte permeabilitatea mutantului faţă de numeroase molecule hidrofobe şi o mutaţie care afectează ADN.

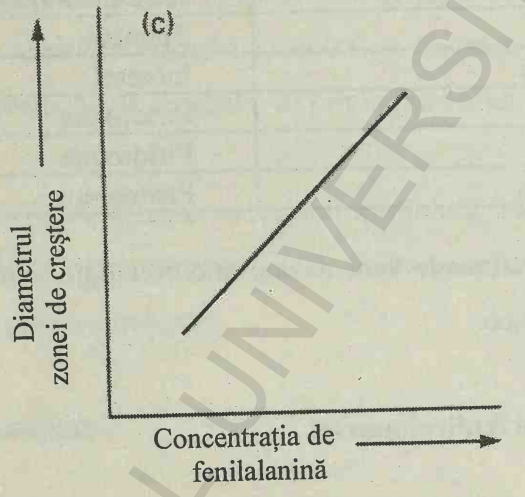


Fig.24.4 Curba standard în testul Guthrie

Mutanţii histidin-dependenţi sunt utilizaţi pentru detectarea mutagenilor care produc substituirea perechilor de baze (în unele tulpini) sau a unor fragmente de gene (la alte specii). Tulpina test şi compusul verificat sunt încorporate în agar topit la 45^0 C care este turnat într-o placă cu mediu minimal de glucoză. Alternativ, mutagenii pot fi aplicaţi pe suprafaţa agarului sub formă lichidă sau cristalizată.

Mediul utilizat pentru stratul agarizat de deasupra conţine urme de histidină pentru a permite bacteriei să treacă prin numeroase diviziuni. După incubare 2 zile la 37^0 C sunt evaluate coloniile revertanţilor şi comparate cu cele din placa martor, din care lipseşte compusul de testat. Fiecare colonie revertantă se consideră că derivă dintr-o celulă care a suferit o mutaţie înapoi la forma sălbatică şi poate sintetiza din nou histidină (Fig.24.5).

Utilizarea enzimelor microbiene în testele de sterilitate

Produsele farmaceutice sterile trebuie testate pentru a detecta prezenţa contaminanţilor bacterieni sau fungici. Dacă produsele conţin antibiotice, acestea trebuie inactivate. Metodele

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

propuse de diferite farmacopei sunt enzimatice: utilizarea de beta-lactamaze pentru inactivarea penicilinelor şi cefalosporinelor, a acetiltransferazelor pentru cloramfenicol, aminoglicozide.

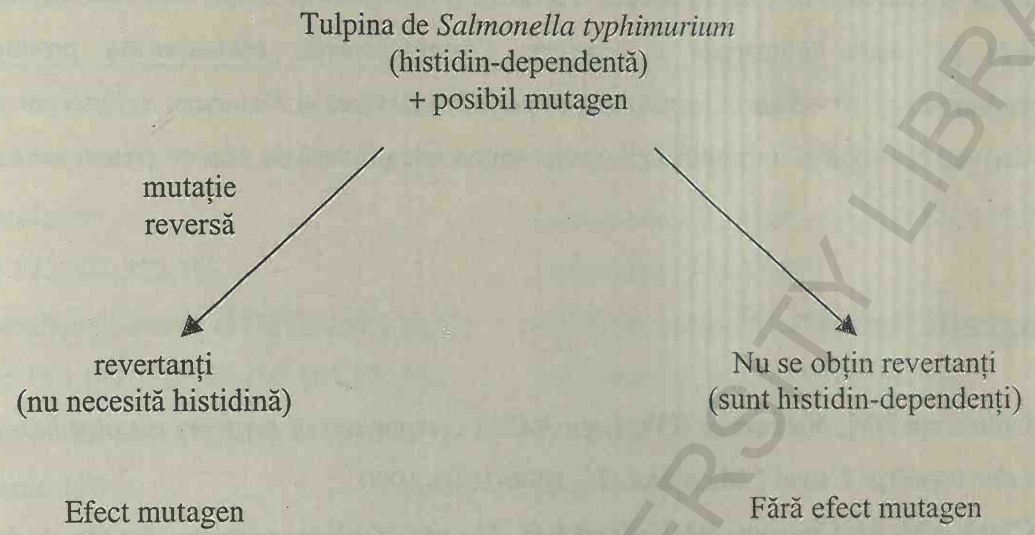


Fig.24.5 Schema testului Ames.

Tehnici de imobilizare a enzimelor

Enzimele sunt deseori utilizate în testele de diagnostic. De exemplu, glucozoxidaza, utilizată în dozarea glucozei sanguine, se obţine din *Aspergillus niger*. Extinderea acestor teste în medicina clinică necesită obţinerea unor enzime imobilizate în electrozi enzimatici. Sistemul are la bază prezenţa unui strat de glucozooxidază pe un electrod de platină.

Pe măsură ce reacţia are loc, oxigenul este consumat (glucoza + oxigen → acid gluconic + peroxid de hidrogen) şi reducerea nivelului de oxigen este detectată de un electrod.

Utilizarea microorganismelor ca modele pentru metabolismul medicamentelor

Siguranţa în administrare şi eficienţa medicamentelor este verificată înainte de introducerea în terapia umană.

Utilizarea modelelor microbiene in vitro pentru testarea medicamentelor este posibilă deoarece sunt numeroase asemănări între anumite enzime bacteriene şi sistemul enzimelor hepatice umane, astfel încât microorganismele pot înlocui animalele în studierea metabolismului medicamentelor.

Metabolismul microbian a fost iniţial utilizat pentru screening-ul microorganismelor care metabolizează substrate reprezentate de medicamente.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De exemplu, impramina (antidepresiv), la mamifere, este metabolizată în 5 metaboliți majori: 2 – hidroxiimpramina, 10 – hidroxiimpramina, iminodibenzil, impramina – N – oxid dezipramina. Metaboliții de impramină pot fi produşi şi de numeroşi fungi, care sunt utilizați pentru producerea pe scară industrială a acestora. *Cunninghamella blakesleeana* produce 2 – hidroxiimpramina şi 10 – hidroxiimpramina; *Aspergillus flavipes* şi *Fusarium oxysporum sp. cepae* produc derivați N – oxid şi iminodibenzil; dezipramina este produsă de *Mucor griseocyanus*.

Bibliografie

Colabrese DM, Nickerson KW, Lane LC. *A comparison of protein crystal subunit sizes in Bacillus thuringensis*. Canad J Microbiol. 26: 1006-1010, 1980.

Clark AM, McChesney JD, Huford CD. *The use of microorganisms for the study of drug metabolism*. Med Res Rev, 5:231-253, 1985.

Haider MZ, Ellar DJ. *Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity-of Bacillus thuringiensis crystal-endotoxin*. Biochem J; 248:197-201, 1987.

Mackoviack PA. *Clinical users of microorganisms and their products*. Am J Med; 67: 213-306, 1979.

Yousten AA. *Bacillus sphaericus: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide*. Adv Biotechnol Processes; 3:315-343, 1984.

Zarnea G. *Tratat de Micrbiologie generală*. Ed. Academiei române, 521-550, 1994.

White RJ. *Microbiological models as sereening tools for anticancer agents: potentials and limitations*. Annu Rev Microbiol; 415-433, 1982.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INDEX

A

Acid clavulanic
-benzoic 142,321,322,367
-etilendiaminotetraacetic (EDTA) 189,213,321
-nalidixic 140,149,152,166,168,175,176,177
-peracetic 87,193,202,296,297
-undecilenic 193
Acinetobacter 23,36,141,299
Actinomyces 339
Adenozintrifosfat 298
Aflatoxina 93,313
Alcaligenes 208,293
Aldehide 193
Alginat de calciu 310,334,335
Amantadina 85,150
Amastigot 272
Amfotericina B, 93,95,136,150,174,175,177,328
Amikacina 138,152,183
Aminoglicozide 137,138,146,152
Ampicilina 57,171,175,179,182,367
Anopheles 267,371
Arbovirus 82
Ascaris lumbricoides 262, 278, 279
Aspergillus
-flavus 94,307
-orizae 375
-parasiticus 94
Aspergiloza 95
Auxotrof 20,21,50,54,91
Aztreonam 135

B

Bacillus anthracis 6,17,33,113,370
Bacillus brevis 33,378
Bacillus cereus 33,98,181,367,376,377
Bacillus licheniformis 33,378
Bacillus megaterium 293,373,374
Bacillus polymyxa 33,378
Bacillus sphaericus 384
Bacillus stearothermophilus 351,360,365,369
Bacillus thuringiensis 370,371,384
Bacitracina 33,132,136,149,378
Bacteriofag 58
Bacteroides 23
Balantidium coli 262,266
Benzilpenicilina 367
Beta-lactamaza 155,315,366,367,376,377,383
Biofilm 35,98,99,104,209,214,290,344
Blastomices dermatidis 92
Bordetella pertussis *102,104,226,233,254*
Botulism 98,257
Brucella 36,139,140
Bruceloza 36

POLITEHNICA UNIVERSITY LIBRARY

C

*Campylobacter*23,37
Candida albicans 91,179,220,299,367
Capsida 10,54,68,70,197,199
Capsomere70
Capsula 15
Carbuncul 153
Carrier 217,219,220,227,255
Catalaza 29,196
Catgut 335,336
Cefaclor 135,152
Cefalexina 135
Cefaloridina 134,177,378
Cefamandol 134,152,175
Cefixim 135,152
Cefotaxim 134,152,181,184
Cefoxitin 134,152
Ceftazidim 135,152,183,184
Ceftriaxona 135,152,176,184
Cefuroxim 134,135,152,179
Cephalosporium 157
Cestode 262,283
Chemoterapie 163,185
Chitina 91
Chlamydia 139
Ciancobalamina 373,381
Ciprofloxacin 152,177,182
Cisticercoza 283
Citokine 117,122,123,326
Citoplasma 15
Claritromicin 165
Clindamicina 34,139,152,176
Clor 72,204,296
Cloramfenicol 140
Clorhexidina 195
Clortetraciclina 139,378
Clorură de benzalconiu 205,206,321,332
Clostridium
-botulinum 33,98,371
-difficile 34,171,181
-perfrigens 33,105,106,115,181
-tetani 18,33,229,254,306,344
Coci Gram pozitivi 31,101,140
Colistin 137,168,177
Complement 29,107,114,125
Compuşi cationici 202
Conjugare 54,227
Coronavirus 73,83,198
Corynebacterium diphteriae 15,178,227,254
Cotrimoxazol 143,168,175,176,180,182
Cresol 321
Creutzfeldt-Jakob 326,351
Cromosom 15,45-60,206
Cryptococcus neoformans 89,92,96,170
Culex 371
Cyclops 281
Cytomegalovirus 198

D

Dextrani1117,314,370,372,373
Dezinfectante 188,189,191,197-209
Diphyllobothrium latum 262
Diplococi 11,32

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Didanozin 85
Difterie 222,227,243,247,250,258
Doxiciclina 139,152
Dracunculus medinensis 262,281

E

EDTA 189,213,321
Encefalite 35,83,232,351
Endotoxina 14,370,371
Enterite 37,232
Enterobacteriaceae 47,104,137
Enterobacter cloacae 293
Enterococi 32,146,151,152,170,185,300
Enterotoxina 48,57
Enterovirusuri 74,184,199,214,300
Epidermophyton flocosum 96
Eritromicina 139,152,165,176,179,185,378
Erwinia carotovora 376
Escherichia coli 8,19,27,47,56,101,180,196
Etambutol 143,149,177
Eucariote 10,11,105,298
Exotoxine 47,105,113,115

F

Fasciola hepatica 262,281,282
Feniletanol 191
Fenol 195,196,211-216,235
Fimbrii 16,101,104
Flageli 10,12,16,54,265
Fleming, Alexander 8,157
Florey, Howard8,157
Fluoroquinolone 141,149,165,168
Formaldehida 193,201,211,254,297,356
Formol 193,202,202,207,212,239
Fosfomicina 132,136
Framicetin 137,138,378
Francisella tularensis 36
Fungi 10,89,91,99,161,181,293,339,351,373

G

Gangrena gazoasă 33,183
Genom 46,70,77-81,89,199
Genotip 43
Gentamicina 137,152,170,175,183,378
Giardia lamblia 262,264,265
Glicocalix 16,98,104,214
Glicopeptide 132,152,169,170,171
Glutaraldehida 193,194,201,213,214
Gonoree 138
Good manufacturing practice (GMP) 162
Griseofulvina 150,175,177,324,378
Guthrie, test 381,382

H

Haemophilus influenzae 36,57,238,255,300
Halogeni 7,113,188,194,213,214
HeLa, linii de celule 74
Herpes zoster 83,85
Hexaclorfen 208
Hexamidina 189

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Helicobacter pylori 37,104
Hemolizine 29,106
Hepatita A 198,231,244
Hepatita B 198,201,231,237
Herpes simplex 82,83,84,85,182,198
Herpes virus 70,82,233,241
Hexetidina 189,205
High efficiency particulate air (HEPA) 290,359
Hipoclorit 5,87,200,296,310,324,340
Histoplasma capsulatum 93
Human imunodefficiency virus(HIV) 84,86,122
Hymenolepis nana 262

I

Idoxuridina 150
Imipenem 177
Imunitate
-dobândită 127,128
-activă 128,244
-pasivă 128,222,244,258
Imunizare 239
Imunoglobulina A (IgA) 118,119,251,244
Imunoglobulina D (IgD) 118,119
Imunoglobulina E (IgE) 118,119,125,244
Imunoglobulina G (IgG) 118,119,121,125,244
Imunoglobulina M (IgM) 118,119,121,244,251
Imunoser 222,235,236
Influenza 231
Iod 5,72,155,189,194,201,204,214
Izopropanpl 201
Isospora belli 262,266

J

Josamicin 139
Jenner Edward 110,223,239

K

Kala azar 262
Kanamicina 57,138,152,157,378
Ketoconazol 93,150
Klebsiella 39,180,347
Koch, Robert 3,6,7
Kuru 86

L

Lactobacillus 305
Leeuwenhoek, Antonie 4
Leishmania 272
Leptospira 41
Leuconostoc 372,374,375
L-forme 14
Limulus test 326
Lipid A 14,105
Lipopolizaharide 14,112,115,195,296,313,326
Lisosim 122
Lisosomi 10,103
Lister, Joseph 5
Listeria 34,65
Luciferin-luciferaza 298

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lincomicina 139,149,166,378
Lincosamide 147
β-lactamaza 155,377

M

Macrofage 99-102,112-126,143
Macrolide 139,147,149,152,168,169,171,378
Malaria 262,268,269,286
Marburg, virus 83,198
Mebendazol 277-280
Mecilinam 134
Mecinikov, Ilia 7,112
Mercur 57,196,208,211,332,367
Mesofite 24
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) 170
Metronidazol 141,170,177,264,265,266,281
Miconazol 150,191,264
Micrococcus spp. 293,307,346
Mucor spp. 95,288,312,339
Mycobacterium tuberculosis 6,15,27,40,86,102

N

Necator americanus 262,278
Negri, corpusculi 8,76
Neisseria gonorrhoeae 11,32,57,107,256
Neisseria meningitidis 32,184,224,226,227
Nematode 262,275,280,286
Neomicina 137,138,157,378
Netilmicina 137,138,152
Neuraminidaza 224,376,377
Nistatina 136,137,150,378
Nitrofurani 141,146,168,169
Nitrofurantoin 141,152,175,176,177
Nitroimidazoli 15
Nocardia 210
Norfloxacin 141,152,182
Novobiocina 141,166,174,175

O

Ofloxacin 141,152
Oleandomicina 378
Operon 46
Otite32,137,179,183,185
Oxacilina 133,151,166
Oxid de etilena 87,189,306,333,352,356,359
Oxitetraciclina 139,378
Ozon 193,296

P

P-aminobenzoic acid (PABA) 367
Parabene 211,214,321,324,367
Pirazinamida 143,149
Pirogene 105,162,290,294,307,326,327,355

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Parvovirus 70, 198
Pasteur, Louis 3,5,6,7,230,370
PBP, Penicillin Binding Proteins 132,146,147
Penicilina G 133,135,151,166,185,378
Penicilinaza 133,134,144,147,183,208,377
Peniciline 133,149,157-162,174-179,315
Penicillium 93,94,312,339
Penicillium chrysogenum 157,377,378
Penicillium notatum 157,378
Penton 70
Peptidoglican 10,19,102,122,132,193,205,213
Peroxid 5,33,87,103,113,191,201,214,296,333
Pertussis vaccin 222,224,227,250,254,255
Pili 55,101,104
Plasmide 46-48,51,56,146,169,206-209
Plasmodium falciparum 267
Plasmodium malariae 267,268
Polimixine 33,136,137,146,169,171,176,177
Poliovirus 230,231,233
Porine 14,22,132,138,146,194,205
Procariote 10,11,67,298
Proteaze 29,87,98,121,314
Proteus mirabilis 216
Protista 10,18
Protozoa 261
Pseudomonas 35,47,48,151,207,293,305,325
Pseudomonas aeruginosa 35,133,141,182,232
Purina 45,49

Q

Quinolone 15,140,141,146,152,165,168,169

R

Rabie, vaccin 224,227,228
Rhabdovirus 68
Rhizopus 95
Ribavirin 150
Ribosomi 10,15,45,67,79,137,139,191,193
Rideal-Walker test 216
Rifampicin 140,143,149,165,168,170,177,186
Rotavirus 73,198,201
Rubeola 198,233,252

S

Sabin, vaccin 230,231,246,251
Saccharomyces cerevisiae 89,90
Salicilanilida 191
Salk, vaccin 224,225,230,231
Salmonella spp. 37,38,55,60,104,116,181,207
Scrapie 86
Staphylococcus aureus 11,17,31,48,101,153,179
Staphylococcus epidermidis 99,206
Staphylococcus saprophyticus 42,180
Sterilizare, prin
-căldură umedă 352,353
-căldură uscată 352,355

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Serratia 37,39,141,147,208,343,347
Sferoplast 14
Shigella boydii 38
Shigella flexneri 38
Shigella sonnei 38
Siderofori 98
Sisomicina 138
Spallanzani, Lazaro 4,6
Spectinomicina 138
Spiramicina 139,267,378
Spirocheta 40
Sporozoit 267
-filtrare 352,358
-radiații 352,358
Streptococcus pneumoniae 31,32,179,226,229
Streptococcus pyogenes 32,60,102,105,163,178
Streptococi 31,32,106,108,115,151,339
Streptokinaza 115,376
Streptomicina 8,48,57,137,149,152,157,174
Streptomyces griseus 157,373,378
Streptomyces spp. 378
Sulfonamide 152,174-177,367
Surfactanți –anionici 314

T

Tazobactam 134
Teicoplanin 132,136,152
Temafloxacin 152
Tetanos 227,237,244,250,254,258
Tetraciclina 57,137,139,152,165,171,175,182
Thiomersal 205
Tobramicina 137,138,152,183,378
Toxoplasma gonidii 262,270,271
Transcripție 79
Transducție 52
Transformare 51
Treponema pallidum 40,107
Triazoli 191
Trichinella spiralis 262,276
Trichomonas vaginalis 265,266
Trichophyton mentagrophytes 96,99,221
Trichophyton spp. 95,96,299
Trichuris trichiura 262,280
Triclosan 205
Trimetoprim 57,142,149,132,179,181,186,267
Trofozoiți 265,266,270,275
Trypanosoma gambiense 262,273,275
Trypanosoma rhodesiense 273
Tymol 196,343

U

Ultraviolete, raze 24,72,84,252,257,292
Uretra 100,101,265
Uretrite 42

V

Vaccinuri 222-239
Vidarabina 85,150

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vancomicina 34,132,136,146,149
Varicella –zoster, virus 198,232
Variola virus 110
Vibrio chlorae 226
Virion 78,80
Virucid 72,214
Vitamina B 373,374,381

W

Waksman, Selman 8,157
Water activity 318

Y

Yersinia enterocolitica 38
Yersinia pestis 38

Z

Zalcitabina 85
Zidovudina 85

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tiparul executat la Polirom S.A. 6600 Iaşi
Calea Chişinăului nr. 32
Tel.: (032) 230323; Fax: (032) 230485

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BOUNDARY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-9476-05-8